

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA



TESIS DOCTORAL

**Influencia pronóstica de la expresión inmunohistoquímica
de las moléculas implicadas en las vías de señalización en
cáncer de próstata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Oderay Mabel Cedeño Díaz

DIRECTORES

Emilio Álvarez Fernández
Federico Rojo Todo

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica



TESIS DOCTORAL

Influencia pronóstica de la expresión inmunohistoquímica de las moléculas implicadas en las vías de señalización en cáncer de próstata.

MEMORIA PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Oderay Mabel Cedeño Díaz.

Directores

Emilio Álvarez Fernández

Federico Rojo Todo

Madrid, 2017

Agradecimientos

Esta tesis doctoral se ha sido posible gracias al apoyo incondicional de mi esposo Bruno y mis hijos, quienes han estado a mi lado, en todos los momentos buenos y difíciles de mi vida.

Quiero agradecer especialmente a mis directores, el Dr. Emilio Álvarez y el Dr. Federico Rojo, quienes me han dedicado su valioso tiempo para poder realizar este estudio de tesis doctoral.

Gracias al departamento de archivo de Hospital General Universitario Gregorio Marañón facilitarme las historias clínicas de los pacientes y también al departamento de archivo de Anatomía Patológica del Hospital Gregorio Marañón que semanalmente me proporcionaban los casos. Al departamento de Biología Molecular y de Inmunohistoquímica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz por la realización de las técnicas inmunohistoquímicas, objetivo del presente estudio.

A mis queridas amigas Ana y Gina, que siempre han estado dándome ánimos y me han ayudado cuando las he necesitado.

A mis padres por todo el cariño que me han dado, que desde la distancia están siempre apoyándome.

Esta tesis se la dedico a mi abuela Antonia y a mi amiga Larissa, que siempre
estarán en mi corazón.

ÍNDICE

ABREVIATURAS1-4
RESUMEN5-16
SUMMARY17-27
1. INTRODUCCIÓN 29-60
1.1. Cáncer de próstata	
1.1.1. Generalidades, definición y epidemiología	
1.1.2. El PSA como método de detección precoz	
1.1.3. Métodos de imagen	
1.1.4. Cáncer de próstata. Recuerdo histórico y actualizaciones en las distintas categorías	
1.1.5. Tipos de tejido para diagnóstico	
1.1.6. Características histopatológicas y comportamiento biológico	
1.1.7. El papel que desempeñan las técnicas inmunohistoquímicas	
1.1.8. Gradación del cáncer de próstata. Nuevas modificaciones en el sistema de gradación	
1.1.9. Factores pronósticos y predictivos en cáncer de próstata	
1.2. Alteraciones genéticas en cáncer de próstata	
1.3. Vía de señalización de transducción de proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases, MAPK)	
1.3.1. MAPK quinasas y su relación en los procesos celulares	
1.3.2. Vía de transducción de ERK1/2 (proteína quinasa reguladora de la señal extracelular)	
1.3.3. Vías de transducción activadas por estrés celular-JNK y p38	
1.3.4. Regulación de la actividad de las vías de transducción de señal de las MAPK: fosfatasas específicas duales (dual-specificity MAPK phosphatases, MKP)	
1.3.5. El papel de MKP-1 y MKP-3 en el cáncer	
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS61-64
3. MATERIAL Y MÉTODOS65-72
3.1. Selección de casos, datos clínicos, variables bioquímicas y selección de material histológico para construcción de matrices de tejidos	
3.1.1. Selección de casos.	
3.1.1.1. Criterios de inclusión	
3.1.1.2. Criterios de exclusión	
3.1.2. Datos clínicos y variables bioquímicas del estudio	
3.1.3. Variables histológicas	
3.1.4. Selección de tejido para realización de las matrices tisulares (tissue-microarrays)	
3.2. Técnicas de Inmunohistoquímicas	
3.3. Valoración de los marcadores inmunohistoquímicos	
3.4. Seguimiento	

3.5. Estudio estadístico

4. RESULTADOS75- 96

4.1. Descripción de la serie

4.1.1. Variables clínicas

4.1.2. Variables morfológicas

4.2. Interpretación de los resultados de las técnicas inmunohistoquímicas

4.2.1. Relación entre la expresión de la forma fosforilada de ERK (pERK) y la fosfatasa MKP-3 con las diferentes categorías de Gleason.

4.2.2. Relación entre la baja expresión de las formas fosforiladas de p38 y ERK, y la supervivencia libre de enfermedad.

4.2.3. La baja expresión de MKP-3 guarda relación con un periodo de recidiva bioquímica más corto en cáncer de próstata.

4.2.4. La baja expresión de MKP-3 guarda relación con periodo libre de enfermedad más corto.

4.2.5. Se ha determinado una relación entre la expresión o ausencia de expresión entre las formas fosforiladas de ERK y JNKp38 con el periodo de recidiva bioquímica.

4.2.6. La baja expresión de MKP-3 se asocia de forma significativa a cáncer de próstata con evolución a un fenotipo andrógeno independiente.

4.2.7. Asociación de las variables morfológicas estudiadas con los distintos marcadores.

Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN)

Invasión de vesículas seminales

Invasión linfática

Inflamación asociada al tumor

5. DISCUSIÓN97-113

6. CONCLUSIONES115-117

7. BIBLIOGRAFÍA119-135

ABREVIATURAS

AI	andrógeno independiente
Akt	quinasa transformante de linfomas AK
BH	bloqueo hormonal
CaPAI	cáncer de próstata con independencia androgénica
DNA	�cido dextribonucleido
DFS	supervivencia libre de enfermedad
DUSP	proteína fosfatasa de especificidad dual
DU145	línea de células de cáncer de próstata no sensitivas a andrógenos
EDTA	�cido etilendiaminotetraacético
EEP	extensión extraprostática
EGF	actor de crecimiento epidérmico
ERK	quinasa regulada por señal extracelular
FFPE	tejido fijado en formaldehído y embebido en parafina
HCC	carcinoma hepatocelular
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
JNK	quinasa c-Jun N-terminal
Ki67	anticuerpo clon 67 contra la proteína proliferante Kiel
LNCaP	línea de células de cáncer de próstata sensitivas a andrógenos
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
MKK o MEK	proteína MAP quinasa quinasa
MKKK	MAP quinasa quinasa quinasa
MKKK o MEKKK	proteína MAP quinasa quinasa quinasa
MKP	proteína fosfatasa de MAP quinasa
MKP-1	proteína fosfatasa de MAP quinasa 1

MKP-2	proteína fosfatasa de MAP quinasa 2
MKP-3	proteína fosfatasa de MAP quinasa 3
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MQ	margen quirúrgico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PSA	Antígeno prostático específico
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PTEN	Homólogo de tensina con actividad fosfatasa.
p38 MAPK	proteína quinasa p38 de MAPK
PC3	línea de células de cáncer de próstata no sensitivas a andrógenos
RA	receptor de andrógeno
RT	radioterapia
RTK	receptor tirosina quinasa
SCC	carcinoma de células escamosas
TGF- β	factor de crecimiento β
TMA	micro-disección de tejido (tissue-microarray)
TNF- β	factor de necrosis tumoral β
VS	vesícula seminal

RESUMEN

CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata es, actualmente, la segunda neoplasia maligna más frecuente en la población masculina, con una estimación de 1,1 millón de nuevos casos al año en 2012, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ¹. Existen diferencias geográficas bien demarcadas respecto a su distribución, siendo esta elevada en Norte América, el Caribe, Brasil, algunos países del oeste de Europa, Australia y Nueva Zelanda, y muy baja en Asia, África y Oriente Medio.

Es la quinta causa más frecuente de muerte en el mundo por malignidad en hombres, con una estimación de 307,000 muertes en 2012, según datos de la OMS ². La mortalidad es más alta en poblaciones de raza negra (África subsahariana y América) y en Escandinavia. La menor tasa de mortalidad se encuentra en Asia, Oriente Medio y Norte de África.

La mayoría de los pacientes a los que se diagnostica cáncer de próstata son hombres mayores de 60 años y sólo un 1% son menores de 50 ³. Datos recientes indican que a partir de los 30 años se inicia la transformación maligna de las glándulas prostáticas y que el 20-25% de pacientes menores de 50 años pueden tener algún foco de cáncer en las glándulas de la próstata ⁴.

Según datos obtenidos de estudios en autopsias, la prevalencia diagnóstica del cáncer de próstata puede variar entre el 15-20% en la población asiática y el 30-40% en la población occidental ⁵. En contraste con la incidencia del diagnóstico clínico, no existe una diferencia significativa en la distribución geográfica ni en las características étnicas, si bien la prevalencia sigue estando directamente relacionada con la edad.

El estilo de vida y la alimentación están íntimamente ligados al desarrollo de diferentes neoplasias, entre ellas el cáncer de próstata. Existe evidencia científica del daño que producen los carcinógenos contenidos en determinadas dietas alimenticias, y los agentes oxidantes que producen inflamación crónica, creando un medio adecuado que sienta las bases para la carcinogénesis ⁶. Estudios epidemiológicos han asociado una dieta con alto contenido en carnes rojas y grasas animales como factores de alto riesgo. También las comidas cocinadas a altas temperaturas y a la brasa, dan resultado a la formación de aminas aromáticas heterocíclicas y carcinógenos hidrocarburos aromáticos policíclicos ⁷⁻⁹. En cambio, alimentos como los ácidos grasos omega-3, el licopene del tomate, la soja, los ácidos grasos de pescado, los crucíferos vegetales (como la coliflor y el brócoli), ejercen un papel protector contra el cáncer ¹⁰.

El uso de hormonas esteroideas y agentes infecciosos ^{11,12}, también ha sido asociados a una respuesta inflamatoria del epitelio prostático. El daño epitelial y la inflamación crónica desencadenan una serie de respuestas ante la agresión continua inducida por el estrés oxidativo de las células, induciendo la expresión de glutatión-S-transferasa y ciclooxigenasa ² ¹³. Posterior a esto, se produce el silenciamiento epigenético de los múltiples genes, incluido el GSTP1, el cual se ha detectado que persiste a través de todas las fases de la progresión del cáncer. Una lesión morfológica, la atrofia proliferativa post-inflamatoria, comparte muchas alteraciones genéticas con la neoplasia intraepitelial prostática y el cáncer de próstata, por lo que se ha asociado como probable evento inicial en el desarrollo de la transformación oncogénica ¹⁴.

Desde la implementación del test de antígeno prostático específico (PSA) en aquellos países donde están establecidos los programas de detección precoz, el diagnóstico de cáncer de próstata clínicamente localizado y en estadios precoces ha aumentado. El tacto rectal no tiene mucha especificidad. Un 25-50% de los cánceres de próstata detectados por un PSA sérico elevado, no son detectados mediante el tacto rectal ¹⁵, esto se debe a que existen condiciones benignas como la hiperplasia prostática y la inflamación que pueden dar falsos negativos a la palpación.

La toma de biopsias mediante ultrasonido transrectal es la técnica de elección en el abordaje diagnóstico, ante la sospecha clínica de cáncer de próstata y, a pesar de sus limitaciones, ha mejorado de forma significativa la incidencia del cáncer de próstata clínicamente diagnosticado. Desde entonces el número de toma de biopsias ha aumentado de forma exponencial y los patólogos nos hemos encontrado con la necesidad de modificar los criterios diagnósticos, para caracterizar lesiones epiteliales prostáticas pequeñas y extremadamente prevalentes que, en muchas ocasiones, corresponden a focos de microcarcinoma ⁴.

Donald Gleason desarrolló en la década de 1960 un sistema de gradación patológica para el adenocarcinoma prostático. Este sistema es ampliamente aceptado y es actualmente utilizado en todo el mundo. Los estudios realizados durante estos años sustentan la utilidad y reproducibilidad de las distintas categorías, que guardan una relación directa entre el grado de diferenciación y el pronóstico a largo plazo.

El sistema de gradación de Gleason está basado en el patrón arquitectural de las glándulas neoplásicas individuales a bajo aumento. Este sistema asigna cinco patrones mayores, en una escala del 1 al 5 (de tumor bien diferenciado a tumor pobremente diferenciado), al patrón glandular primario (dominante) y al secundario (segundo más prevalente). Estos dos grados se suman para obtener un valor que varía entre 2 (1+1) y 10 (5+5): “cuanto mayor es el valor, menor es el grado diferenciación, lo que conlleva un peor pronóstico a largo plazo”.

Este sistema de gradación morfológico fue desarrollado con la finalidad de proporcionar información fundamental que permita estratificar grupos de pacientes y así poder determinar el manejo y tratamiento para cada uno de ellos.

Los tipos de tejido en los que habitualmente realizamos el diagnóstico de cáncer, provienen de biopsias de cilindro con aguja. Este es el tipo de muestra más utilizada, que se obtiene mediante ultrasonido transrectal con una aguja de 18G. Se suelen obtener entre 10 y 12 cilindros más algunos cilindros adicionales de nódulos sospechosos ¹⁶. El diagnóstico incidental de carcinoma de próstata en material procedente de cirugías de resección transuretral, puede variar entre el 5-8% según las series ^{17,18} o en piezas de enucleación, en el 4,5% aproximadamente, ambas procedentes de pacientes con hiperplasia prostática benigna ^{16,19}.

La prostatectomía radical es el tratamiento de primera elección con intención curativa para carcinoma de próstata clínicamente localizado. Si bien existen otras opciones terapéuticas que son determinadas por el grado histológico y criterios clínicos, como pueden ser la terapia de ablación androgénica y la braquiterapia.

Características Anatomopatológicas

La mayoría de los cánceres de próstata son multifocales, con un promedio de 2-3 nódulos separados en la glándula. Un 75-80% están localizados en la zona posterior o posterolateral periférica ²⁰, aunque también pueden localizarse en la zona anterior periférica o en la zona transicional. La localización central es excepcional y, con frecuencia, suele ser por extensión de un tumor periférico.

Los criterios morfológicos para el diagnóstico del cáncer de próstata se basan en una serie de características arquitecturales, nucleares y citoplasmáticas. Una característica imprescindible en el diagnóstico de cáncer es la ausencia de células basales, la cual podemos corroborar mediante técnicas inmunohistoquímicas como citoqueratinas de alto peso molecular *34beta12* o *p63*, que habitualmente tiñen células basales, con un resultado negativo en glándulas malignas debido a su ausencia. Otra tinción inmunohistoquímica es la *Alfa-methylacyl-CoA-racemasa (AMACR)*, positiva en gran parte de casos de cáncer de próstata con una expresión granular citoplasmática en las células neoplásicas.

Las células neoplásicas del cáncer de próstata suelen tener núcleos grandes con nucléolos prominentes. Si bien, variantes específicas como el adenocarcinoma de bajo grado (Gleason 4 y 5), el adenocarcinoma de células espumosas y el adenocarcinoma de células transicionales, pueden tener un nucléolo muy pequeño o incluso no tenerlo. El citoplasma suele ser más amfófilico comparado con el citoplasma claro y pálido de las glándulas normales que le rodean ²¹.

Las figuras de mitosis son más frecuente encontrarlas en piezas de prostatectomía de tumores de alto grado ^{21,22}. Los cuerpos apoptóticos son, con mayor frecuencia, observados en focos de carcinoma y neoplasia intraepitelial prostática hasta en el 13% de los casos y excepcionalmente en el tejido normal.

Factores predictivos y pronósticos

El factor pronóstico y predictivo en cáncer de próstata más importante es el grado de Gleason. En la biopsia, este grado sirve para predecir los hallazgos histológicos en la pieza de prostatectomía, el estadio postoperatorio, estimar el riesgo de progresión de la enfermedad y la mortalidad específica asociada al cáncer ²³⁻²⁵.

Después del grado de Gleason, el estadio patológico es el segundo factor predictivo más importante ²⁶, seguido de la extensión extraprostática ²⁷, la invasión de las vesículas seminales y el estado de los márgenes quirúrgicos ^{28,29}. La invasión linfovasculares es variable, pudiéndose ver entre el 5-53% de la piezas de prostatectomía radical ³⁰. El tamaño tumoral es de importancia pronostica pero no se ha establecido como un factor predictor independiente ³¹, así como tampoco la invasión nerviosa ³².

Las alteraciones genéticas en el cáncer de próstata

Recientemente se ha podido estudiar el primer genoma completo de secuenciación que muestra reordenamientos complejos ^{33,34}.

Como todos los cánceres, el cáncer de próstata también se desarrolla por un desequilibrio en la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores tumorales.

Existen múltiples genes y vías implicadas en la génesis del cáncer de próstata. Lesiones en la vía de PI3K ocurren en el 25-70% de los cánceres de próstata y detectándose también en los nódulos metastásicos³⁵. Deleciones genómicas y mutaciones puntuales inactivantes en el gen supresor tumoral PTEN (10q23) están presentes en el 50% de los casos y son aún más prevalentes en la enfermedad avanzada³⁴⁻³⁹. También se ha determinado la amplificación del gen Myc, promotor del ciclo celular, también presente en el cáncer de próstata³⁷⁻³⁹. Y estudios recientes han demostrado la presencia de deleciones y mutaciones puntuales en el locus del gen supresor tumoral p53 en el 70% de los cánceres de próstata³⁷⁻³⁹.

La secuencia de proteínas quinasas activadas por mitógenos, o MAPK, ha sido desde hace algunos años implicada en la génesis de múltiples líneas celulares del cáncer y más recientemente también en cáncer de próstata.

Esta familia de proteínas constituye una familia altamente conservada de módulos de quinasas que participan en la transmisión de señales extracelulares a efectores dentro de la célula, que controlan procesos vitales como la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis. Las MAPK son activadas en respuesta a diversos estímulos que inducen la fosforilación de sus residuos de treonina y tirosina, cuya acción está mediada por quinasas MAP específicas (MKP)⁴⁰

Se han descrito tres grupos mayores de MAPK basados en la similitud de sus secuencias, activación por diferentes agonistas y especificidad del sustrato. Estas son la quinasas reguladoras de señales extracelulares (ERK1/2) relacionada fundamentalmente a la proliferación celular, la quinasa con extremo amino-terminal c-Jun (JNK) y p38 MAPK, estas dos últimas con funciones pro-apoptóticas⁴¹

Esta vía tiene un mecanismo auto-regulatorio en el que la activación inducida por estrés de p38 y JNK induce apoptosis, esto a su vez induce un aumento de la actividad de la vía de ERK1/2. Niveles elevados de ERK1/2 fosforilado estimulan la expresión de MKP-1, que a su vez aumenta la desfosforilación de p38 y JNK, reduciendo de esta manera la apoptosis. Es por esto que la participación de ERK, JNK y p38, ya sea como promotores o supresores, es a veces controvertida. Esto parece depender de forma directa del tipo de célula estimulada, así como del tipo específico de estímulo y del tiempo de duración del estímulo.

Las funciones de MKP son complejas y tienen la capacidad de modular diferencialmente múltiples vías de la cascada de MAPK, a parte de las antes mencionadas, que dan lugar a respuestas biológicas completamente distintas, incluso en una misma célula. Estas proteínas están distribuidas ampliamente por todos los tejidos en humanos, y participan en los procesos fisiológicos de la célula, como la homeostasis, embriogénesis y en la respuesta inmunológica. Debido a esto, las MAPK han sido implicadas en la carcinogénesis de un amplio grupo de neoplasias malignas, incluido el cáncer de próstata.

De la familia de las MKP, MKP-1 puede estar sobre-expresada en estadios iniciales de la tumorigénesis y la disminución de la expresión se asocia a tumores de alto grado, enfermedad avanzada y metástasis. La expresión de MKP-3 parece tener el mismo patrón de expresión, y puede estar disminuida o ausente en estadios avanzados de la enfermedad al igual que MKP-1. Ambas parecen ser buenos indicadores de progresión del cáncer y se han asociado a resistencia-androgénica. La sobre-expresión de las formas fosforiladas de ERK, p38 y JNK ha sido descrita en la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y estadios iniciales del cáncer de próstata, con una disminución progresiva de la expresión hasta estar ausente en estadios avanzados y metástasis.

En el presente estudio analizaremos la expresión de estas fosfatasa MKP-1 y MKP-3 y de sus substratos MAPK, debido a su implicación en los procesos fisiológicos de la célula y su participación en la carcinogénesis, MKP-1 y MKP-3 pueden ser factores pronósticos en cáncer de próstata que según el patrón de expresión, nos permitan categorizar grupos con mayor riesgo de recidiva y progresión de la enfermedad. Además de ser posibles predictores de la respuesta a la quimioterapia, podrían constituir una atractiva diana terapéutica.

Los resultados procedentes de los estudios publicados en los últimos años y el presente, quizás contribuyan a desarrollar terapias efectivas que tengan como diana MAPK específicas que intervengan de forma directa sobre el desarrollo del tumor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción de la serie

La serie comprende pacientes varones con adenocarcinoma de próstata, que fueron tratados mediante prostatectomía radical retropúbica y linfadenectomía bilateral, entre los años 1995 y 1997 en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, España), con un total de casos de 95 pacientes. Fueron excluidos 7 casos a los que no se tuvo acceso a la historia clínica. Los pacientes habían sido seguidos durante un periodo mínimo de 13 años, con determinaciones bioquímicas periódicas de PSA cada seis meses hasta el punto de corte del seguimiento que se hizo en diciembre de 2010.

Se recogieron datos procedentes de las historias clínicas:

- *fecha de nacimiento*
- *edad al momento del diagnóstico*
- *fecha de la cirugía de prostatectomía*
- *estadio TNM al momento del diagnóstico*
- *PSA preoperatorio*
- *tratamiento con bloqueo hormonal o radioterapia previo a la cirugía*
- *presencia de metástasis al momento del diagnóstico*
- *valores PSA de seguimiento postquirúrgico*
- *tiempo de recidiva bioquímica postquirúrgico*
- *bloqueo hormonal o radioterapia postquirúrgico*

- *desarrollo de enfermedad a distancia*
- *desarrollo de otras neoplasias*
- *muerte por enfermedad u otra causa*

Las variables independientes analizadas fueron la edad y el PSA prequirúrgico. El tiempo hasta la recidiva bioquímica, medido en meses desde el momento del diagnóstico. La recidiva bioquímica se definió como un valor de PSA superior a 0,2 ng/ml en una determinación en sangre posterior a la cirugía.

Solo 3 pacientes recibieron bloqueo hormonal (BH) y 2 pacientes radioterapia (RT) previo a la prostatectomía radical (PR).

De nuestra serie, 20 pacientes evolucionaron al estado de independencia androgénica, tras haber sido tratados con ablación androgénica por recidiva bioquímica de la enfermedad, 11 pacientes desarrollaron metástasis posterior a la cirugía, tratamiento hormonal o radioterapia.

Variables morfológicas

Todo el material analizado procede de bloques de parafina del archivo del servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, España).

Las próstatas fueron previamente pesadas y medidas, fijadas en formol al 10% y pintadas con tinta china, para determinar el estado de los márgenes de resección, un factor pronóstico importante y directamente relacionado con la probabilidad de recidiva tumoral en el lecho quirúrgico. Las próstatas fueron incluidas en su totalidad en parafina.

En el estudio histológico del tumor en su totalidad, se determinó:

- *Grado de diferenciación, según los criterios descritos por Donald Gleason.*
- *Patrón 1 y 2, que corresponden a tumores bien diferenciados, prácticamente semejantes a glándulas normales de la próstata, que con frecuencia son nodulares y bien definidos.*
- *Patrón 3, que corresponde a un tumor de bordes más imprecisos compuestos por glándulas tumorales cuyo tamaño puede ser variable, desde pequeño a medio, pero usualmente separadas entre sí.*
- *El patrón 4 y 5 son patrones que implican un peor grado de diferenciación y consecuentemente un peor pronóstico. En el patrón 4 el tumor suele ser de bordes imprecisos y las glándulas suelen ser complejas, mal formadas, fusionadas o con patrón cribiforme. En cambio, en el patrón 5 el crecimiento suele ser aún más difuso, sólido, dispuesto en sábanas o cordones, y podemos encontrar células en anillo de sello.*

Establecimos diferentes categorías de la siguiente manera:

- **Grupo 1:** *aquellos con patrón homogéneo 3 corresponde a un score de Gleason 6 (3+3).*

- **Grupo 2:** los que mostraban un patrón combinado con predominio de patrón 3 y patrón 4 secundario(3+4), con o sin tercer patrón 5
- **Grupo 3:** los que mostraban un patrón combinado con predominio de patrón 4 y patrón 3 secundario(4+3), con o sin tercer patrón 5
- **Grupo 4:** tumores pobremente diferenciados con un Gleason igual o mayor a 8 (4+4), 4+5), (5+4), (5+5).

Otras variables morfológicas estudiadas con una influencia pronóstica en el periodo libre de enfermedad son:

- la extensión extraprostática (EEP) del tumor
- el estado de los márgenes quirúrgicos (MQ)
- la invasión de las vesículas seminales (VS)
- la presencia de invasión vascular y/o linfática
- se consideró invasión perineural cuando los fascículos nerviosos estaban rodeados completamente por glándulas tumorales.
- la presencia de neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN)
- localización del tumor, bilateral, derecho o izquierdo
- presencia de carcinoma intraductal
- infiltrado inflamatorio acompañante

Algunos de los casos en la evolución de la enfermedad desarrollaron metástasis a distancia, exclusivamente óseas, a costillas, vertebrales dorsales y lumbares, cráneo, rama isquiática, sacroiliaca y fémur.

A todos los pacientes se les realizó linfadenectomía bilateral reglada. Solo dos pacientes presentaron metástasis ganglionares en un ganglio linfático.

Seguimiento

Los pacientes fueron seguidos en el Servicio de Urología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón mediante determinaciones del PSA, con una media de 173.5 meses (rango 7-205) hasta la finalización del estudio en 2010.

Selección de tejido para realización de las matrices tisulares (tissue microarrays)

Posterior a esta evaluación se procedió a seleccionar 2-3 zonas al microscopio óptico de muestras de tejido parafinado para realizar micro-disección de tejido, con un total de 555 zonas tumorales, en las que también estaban representadas: tejido prostático normal, hiperplasia glandular y PIN.

Técnicas de Inmunohistoquímicas

De los bloques de parafina se realizaron cortes a 3 micras, utilizando un micrótopo, uno para hematoxilina-eosina para confirmar la presencia de células tumorales y cinco cortes adicionales montados sobre cristales portaobjetos, para su posterior proceso de desparafinización, hidratación con xilol y alcoholes en gradación decreciente (100°, 96°, 70°) y agua bidestilada. Los cortes colocados en portaobjetos especiales para inmunotinciones tuvieron un proceso previo consistente en una recuperación antigénica a alta temperatura, en presencia de un tampón de EDTA a pH 9 de Dako. Tras esta

recuperación antigénica, los portaobjetos fueron incubados con el anticuerpo primario correspondiente y a continuación, con los polímeros conjugados con anti-Ig de caballo y rábano apropiados (Flex+, Dako). La visualización de las secciones teñidas se realizó con el cromógeno ,3 -diaminobencidina. Todas estas tinciones se ejecutaron utilizando el autoteñidor Dako Autostainer.

Los anticuerpos utilizados fueron MKP-1 sc-1102 (Santa Cruz Biotechnology); MKP-3 sc-377070 (Santa Cruz Biotechnology); JNK pAb, Rabbit, (pTPpY) (Promega); PHO-P44/42MAPK (THR202/TYR204) D13.14.4E 1674370S (Izasa) y PHOSPHO-P38 MAPK (THR180/TYR182)(D3F9) 1674511S (Izasa).

Valoración de los marcadores inmunohistoquímicos

Las tinciones inmunohistoquímicas fueron revisadas por dos patólogos con desconocimiento de los datos clínicos, así como del grado tumoral y de la asociación entre los distintos cortes de tejido.

La expresión de la quinasa MKP-1 y las formas fosforiladas de MAPK, p38 y JNK fueron valoradas en el núcleo, pERK fue valorada en núcleo y citoplasma, y MKP-3 en el citoplasma de las células tumorales. Al disponer de tejido normal, glándulas hiperplásicas y tejido con PIN, contábamos con controles internos.

Para dar un valor cuantitativo a la expresión de estos marcadores, se calculó mediante una escala de expresión semi-cuantitativa o Histo-score (H-score), en el que se considera el porcentaje de células con expresión y la intensidad de la expresión. La intensidad se evalúa en cuatro categorías, que van de 0 a 3, siendo 0 un valor negativo y 3 una tinción intensa. El Histo-score se calcula aplicando un factor de corrección al porcentaje en cada una de las intensidades de expresión, de acuerdo con la siguiente fórmula, con un resultado que oscila entre 0-300:

$$H\text{-score} = (\text{expresión baja } \%) \times 1 + (\text{expresión intermedia } \%) \times 2 + (\text{expresión fuerte } \%) \times 3$$

RESULTADOS

Variables clínicas:

- La media de edad en el momento de la cirugía fue 64 años (rango 45-74).
- El nivel medio de PSA prequirúrgico fue de 13,3 ng/dl (rango 5,2-430).
- Al momento del diagnóstico la gran de los pacientes se encontraba en un estadio clínico pT2c (20 casos, 25,6 %).
- 47 casos (53,4%) tuvieron recaída bioquímica de la enfermedad, con niveles de PSA postoperatorio por encima de 0,2 ng/ml, en una mediana de tiempo de 84,18 meses (rango de 1-205 meses).
- Ningún paciente tenía metástasis al momento del diagnóstico.

Variables morfológicas:

- *El patrón de Gleason más prevalente era el Gleason 6: 36 casos. El resto estaban distribuidos de la siguiente manera, Gleason 7 (3+4): 19 casos, Gleason 7 (4+3) con 18 casos y Gleason 8 o mayor con 22 casos.*
- *De los 95 casos, 75 (78,9%) de los tumores tenían una localización bilateral, del resto 12 (12,6%) se localizaban en el lóbulo derecho y 8 (8,4%) se localizaban en el lóbulo izquierdo.*
- *La extensión extraprostática (EEP) se observó en 35 casos (36,8%), la mayor parte de ellos, 33 casos la afectación era focal.*
- *31 casos tenían invasión de las vesículas seminales (32,6%).*
- *Las invasiones linfáticas eran más frecuentes que las vasculares, observándose invasiones linfáticas en 62 casos (65,3%) casos y en 30 casos (31,6%) invasiones vasculares.*
- *La invasión capsular se identificó en 91 casos (95,8%)*
- *La invasión perineural era la norma, estaba presente en 86 casos (90,5%).*
- *La neoplasia intraepitelial prostática (PIN) determinó en el 84,2% de los casos.*
- *El carcinoma intraductal se identificó en 15 casos, en un volumen inferior al 5% y todos estaban asociados a tumores de alto grado.*
- *Los márgenes de resección estaban con frecuencia afectados, observándose glándulas en contacto con el margen tintado en 43 casos (45,3%).*
- *En solo 2 pacientes se identificó metástasis ganglionar de adenocarcinoma en la pieza de linfadenectomía. En cada paciente solo había afectación de un ganglio (2,1%).*

De los 95 pacientes incluidos en el estudio fallecieron 4 pacientes a causa de la enfermedad.

Interpretación de los marcadores inmunohistoquímicos:

Se encontraron relaciones estadísticamente significativas con los siguientes enunciados:

-La expresión de la forma fosforilada de ERK (pERK) y la fosfatasa MKP-3 guarda relación con las diferentes categorías de Gleason.

-La baja expresión de las formas fosforiladas de p38 y ERK guarda relación con un periodo libre de enfermedad más corto.

-La baja expresión de MKP-3 guarda relación con un periodo de recidiva bioquímica más corto y un periodo libre de enfermedad más corto.

-Se ha determinado una relación entre la expresión o ausencia de expresión entre los marcadores ERK con JNK y p38 con el periodo de recidiva bioquímica.

-La baja expresión de MKP-3 se asocia de forma significativa a cáncer de próstata con evolución a un fenotipo andrógeno independiente.

-MKP-3 esta sobre-expresado en la neoplasia intraepitelial prostática.

MKP-1 era otra de las fosfatasa objetivo de nuestro estudio, sin embargo los resultados obtenidos, nos han sido los esperados. El hallazgo de la expresión citoplásmica de MKP-1 en ausencia de expresión nuclear, en nuestras muestras de carcinoma de próstata no está descrito en la literatura. Solo uno de los casos mostró dudosa tinción nuclear. Debido a esto no pudimos dar valor a esta tinción ya que MKP-1 es una quinasa nuclear específica.

CONCLUSIONES

1.-MKP-3 es un marcador pronóstico independiente del periodo libre de enfermedad en cáncer de próstata.

2.-MKP-3 esta sobre-expresada en estadios iniciales de la enfermedad, confiriendo un estado de aparente protección en lesiones pre-invasivas como el PIN de alto grado, con una posterior disminución o pérdida de la expresión en lesiones infiltrantes, que se asocia a un periodo de recidiva bioquímica más corto, peor pronóstico y progresión a un estado de independencia androgénica.

3.-La disminución o pérdida de expresión de la forma fosforilada de p38 se asocia a un periodo libre de enfermedad más corto.

4.-Los carcinomas de próstata con independencia androgénica se asocian a baja expresión de MKP-3 y baja expresión de ERK, lo que sugiere que la estimulación de los receptores de andrógenos puede estar regulada por otra vía diferente a MAPK.

5.-MKP-3 es una potencial diana terapéutica a estudiar en vistas de buscar nuevas terapias para aquellos pacientes con carcinomas de próstata en estadios avanzados o aquellos que han evolucionado a estado de independencia androgénica, para los que las opciones de tratamiento son escasas.

6.- La expresión citoplásmica sin expresión nuclear de MKP-1 supone un hallazgo no esperado, por lo que la interpretación de los resultados deben ser analizados y valorados con cautela, ya que en la literatura actual no hemos encontrado resultados similares.

SUMMARY

PROSTATE CANCER

Prostate cancer is the second most common malignancy among world male population, with an estimation of 1,1 million new cases in 2012, according to World Health Organization (WHO) ¹. There are major differences between geographical regions, being highly recurrent in North America, The Caribbean, Brazil, some Western European countries, Australia and New Zealand, and very low recurrent in Asia, Africa and Middle East.

It is the fifth most frequent cause of death in the world by malignancy in men, with an estimation of 307,000 deaths in 2012, according to latest WHO publication ². Mortality is higher in black populations in sub-Saharan Africa, the Caribbean, black Americans and Scandinavia. The lowest mortality rate is found in Asia, Middle East and North Africa.

The majority of patients diagnosed with prostate cancer are men over 60 years old and only 1% are under 50 ³. Recent data indicates that from the third decade of life starts the malignant transformation of the prostate glands and 20-25% of patients under 50 years may harbour a foci of cancer in their glands ⁴.

According to data obtained from autopsy studies, diagnostic prevalence of prostate cancer can vary between 15-20% in the Asian population and between 30-40% in western population ⁵. In contrast to the incidence of clinical diagnosis, there is no significant difference in geographic distribution or ethnic characteristics, although prevalence remains directly related to age.

Lifestyle and diet are intimately linked to the development of neoplasia, one of which is prostate cancer. There is scientific evidence of the damage of carcinogens, contained in diets, and oxidizing agents, that produce chronic inflammation, creating a suitable medium for development of cancer ⁶. Epidemiological studies have associated a diet with a high content of red meat and animal fats, as high risk factors. As well as meals cooked at high temperatures and charbroiling of red meat, which result in the formation of aromatic heterocyclic aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens ⁷⁻⁹. On the other hand, foods such as omega-3 fatty acids, tomato lycopene, soy, vegetables cruciferous (such as cauliflower and broccoli), play a protective role against cancer ¹⁰.

The use of steroid hormones and infectious agents ^{11,12} has also been associated with an inflammatory response of prostatic epithelium. Epithelial damage and chronic inflammation trigger a series of responses to continuous aggression induced by oxidative stress in cells, inducing the expression of glutathione-S-transferases and cyclooxygenase-2 ¹³. Subsequent to this occurs the epigenetic silencing of the multiple genes, including GSTP1, which has been detected, persists throughout all stages of cancer progression. A morphological lesion, the post-inflammatory proliferative atrophy, shares many genetic alterations with prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer, therefore it has been associated as a probable initial event in the development of oncogenic transformation ¹⁴.

Since the implementation of the prostate-specific antigen (PSA) test in those countries where early detection programs are established, the diagnosis of clinically

localized prostate cancer in early stages has increased. Abnormal rectal examination does not have much specificity. Between 25-50% of prostate cancers detected by serum PSA, are not detected by rectal examination¹⁵, since there are benign conditions such as prostatic hyperplasia and inflammation that can show false negative at palpation.

Biopsy using transrectal ultrasound is the technique of choice in the diagnostic approach to the clinical suspicion of prostate cancer and despite its limitations; it has significantly improved the incidence of clinically diagnosed prostate cancer. Since then, the number of biopsies has increased exponentially and pathologists have found the need to modify the diagnostic criteria to characterize small and extremely prevalent prostate epithelial lesions, which in many cases correspond to focus of microcarcinoma⁴.

Donald Gleason developed in the 1960s a pathological gradation system for prostatic adenocarcinoma. This system is widely accepted and it is currently used worldwide. Studies carried out during these years support the usefulness and reproducibility of the different categories, which have a direct relationship between the degree of differentiation and the long-term prognosis.

The Gleason gradation system is based on the architectural pattern of the individual neoplastic glands at low magnification. This system assigns five major patterns, on a scale from 1 to 5 (from well differentiated tumour to poorly differentiated tumour), to the primary glandular pattern (dominant) and the secondary (second most prevalent). These two grades are added up to obtain a value that varies between 2 (1 + 1) and 10 (5 + 5): "The higher the value, the lower the degree of differentiation, which leads to a worse prognosis".

This system of morphological gradation was developed with the objective of providing fundamental information to allow to stratify groups of patients and thus to be able to determine the handling and treatment for each one of them.

The types of tissue in which we usually diagnosis cancer are needle cores biopsies. This is the type of sample most commonly used, which is obtained by transrectal ultrasound with an 18G needle. 10-12 cylinders, plus a few extra core of suspect nodules, are usually obtained¹⁶. The incidental diagnosis of prostate carcinoma in material from transurethral resection surgeries may vary between 5-8%^{17,18} according to the series or in specimens of enucleation, approximately 4,5%, both from patients with benign prostatic hyperplasia^{16,19}.

Radical prostatectomy is the definitive treatment with curative intention for clinically localized prostate carcinoma. Although there are other therapeutic options that are determined by the histological grade and clinical criteria, such as androgenic deprivation therapy and radiotherapy.

Anatomopathological features

Most prostate cancers are multifocal, with an average of 2-3 separate nodules in the gland. Between 75-80% are located in the posterior or posterolateral peripheral area²⁰. But it can localize in the anterior peripheral zone or transitional zone. The central location is exceptional and is due to an extension of a peripheral tumour.

Morphological criteria for the diagnosis of prostate cancer are based on a constellation of architectural, nuclear and cytoplasmic features. An essential feature in the diagnosis of cancer is the absence of basal cells, which can be corroborated by immunohistochemical techniques such as *34beta12* or *p63*, high molecular weight cytokeratins, which usually stain basal cells, with a negative result in malignant glands due to their absence. Another immunohistochemical staining is *alpha-methyl acyl-CoA-racemase* (AMACR), which is highly positive in prostate cancer with granular cytoplasmic expression in neoplastic cells.

Malignant prostate cancer cells usually have large nuclei with prominent nucleoli and amphophilic cytoplasm compared to the clear and pale cytoplasm of the normal glands²¹. Mitotic figures are more frequently found in pieces of prostatectomy of high-grade tumours^{21,22} and apoptotic bodies in foci of carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia in up to 13% of cases and, exceptionally, in normal tissue.

Predictive and prognostic factors

The most important prognostic and predictive factor is the Gleason grade. At biopsy Gleason grade is used to predict the histological findings in prostatectomy specimen, the postoperative stage, to estimate the risk of progression of the disease and the specific mortality associated with cancer²³⁻²⁵.

After Gleason grade, the pathological stage is second more important predictive factor²⁶, followed by the extraprostatic extension²⁷, the invasion of the seminal vesicles and the state of the surgical margins^{28,29}. Lymphovascular invasions can be found in 5-53% of radical prostatectomy specimens³⁰. Tumour size is of prognostic significance but has not been established as an independent predictor factor³¹, nor is it invasion of the nerve³².

Genetic alterations in prostate cancer

Recently it has been possible to study the first whole-genome sequencing studies revealed complex rearrangements^{33,34}. As all cancers, prostate cancer also develops because of an imbalance in oncogene activation and tumour suppressor inactivation.

There are multiple genes and pathways involved in the genesis of prostate cancer. Lesions in the PI3K pathway occur in 25-70% of prostate cancers and are also detected in metastatic³⁵. Genomic deletions and inactivating point mutations in the tumour suppressor gene PTEN (10q23) are present in 50% of cases and are even more prevalent in advanced disease³⁴⁻³⁹. Amplification of the Myc gene, a cell cycle promoter, also present in prostate cancer, has also been implicated³⁷⁻³⁹. Recent studies have demonstrated the presence of deletions and point mutations at the tumour suppressor gene locus p53 in 70% of prostate cancers³⁷⁻³⁹.

For several years, the sequence of mitogen-activated protein kinases, or MAPK, has been involved in the genesis of multiple cancer cell lines and more recently, prostate cancer.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) constitute a highly conserved family module of kinases that provide a link between transmembrane signalling to

intracellular effectors to control cellular activities including cell proliferation, differentiation surveillance and apoptosis. MAPK are activated in response to different stimulus that induces the phosphorylation of treonina/tirosina residues, and this is mediated through MAP kinases (MKP).

There are three main groups that integrate the MAPK family, based on sequence similitude, different agonist and substrate specificity. These kinases are the extracellular signal-regulated protein kinases (ERK1/2, p44/p42), mainly related to proliferation, stress-activated protein kinase c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK, these two formers related to apoptosis.

This pathway has an autoregulatory system. When p38 MAPK and JNK activated, they induce apoptosis, these in turns elevate ERK1/2 activity with increment in cell proliferation. High levels of phosphorylated ERK1/2 stimulate MKP-1, which in turn promotes desphosphorilation of p38 and JNK, decreasing apoptosis. By this way ERK, p38 and JNK has a controversial participation sometimes like promoters or suppressors, these seems to depend directly of the cell type and the specific stimulus.

MAPK function is complex and has the ability of differentially modulate multiples pathway of the MAPK cascade, a part of the previously mentioned that leads to complete different biological responses in the same cell.

These proteins are thoroughly distributing in all humans tissues and participate in biological cell process as homeostasis, embryogenesis, and immunological response. Due to this, MAPK has been implicated in carcinogenesis in a wide range of malignancies, including prostate cancer.

Of the MAPK family, MKP-1 could be overexpress in initials states of tumorogénesis, and the lowering in the expression is related to high grade tumours, advanced disease an metastases. The MKP-3 expression seems to have the same expression pattern, and could be lowered o loss in very advanced stage of disease in the same way that does MKP-1. Both seems to be good progression indicators markers of cancer and has been associated to androgen therapy ablation resistance. ERK, p38 and JNK overexpression has been describe in the intraepithelial prostate neoplasia and initial stages of prostate cancer, with a downregulation and loss of expression in advanced cancer y metastases.

In this study we will analyse the expression of these MKP-1 and MKP-3 phosphatases and their MAPK substrates, due to their involvement in the physiological processes of the cell and its participation in carcinogenesis, MKP-1 and MKP-3 can be prognostic factors in prostate cancer that according to the pattern of expression, which allow us to categorize groups with higher risk of relapse and disease progression. In addition to being possible predictors of the response to chemotherapy, they could be an attractive therapeutic target.

Results from last year's publications and the present study, may contribute to the development of effective therapies that have specific MAPK involve in tumour development as target.

MATERIAL AND METHODS

The series comprises male patients with prostate carcinoma, who were treated by radical retropubic prostatectomy and bilateral lymphadenectomy between 1995 and 1997 at Hospital Universitario Gregorio Marañón (Madrid, Spain), with a total of 95 patients. Those cases to which the medical history was not available were excluded, with a total of 7 cases excluded. Patients had been followed for a period of 13 years, with periodic biochemical PSA determinations every six months until the cutoff point of follow-up that was made in December 2010.

The following data was collected from the medical records:

- *date of birth*
- *age at the time of diagnosis*
- *date of prostatectomy surgery*
- *TNM stage at the time of diagnosis*
- *preoperative PSA*
- *treatment with androgen ablation or radiotherapy prior to surgery*
- *presence of metastases at the time of diagnosis*
- *postoperative PSA values*
- *postsurgical biochemical recurrence*
- *postsurgical androgen ablation or radiotherapy*
- *development of distance disease*
- *development of other neoplasias*
- *death cancer associated or to other cause*

The independent variables analysed were age and preoperative PSA. Time to biochemical recurrence, was measured in months from the time of diagnosis. Biochemical recurrence was defined as a PSA value greater than 0,2 ng/ml in a post-surgery control.

Only 3 patients received androgen ablation therapy and 2 received radiotherapy prior to radical prostatectomy.

From our series, 20 patients evolved to androgenic independent state, after being treated with androgenic ablation for biochemical recurrence of the disease. 11 patients developed metastasis after surgery and hormonal treatment or radiotherapy.

Morphological variables

All the material analysed comes from paraffin blocks from the archive of the Pathology Department at the Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, Spain).

The prostates were previously weighed and measured, fixed in 10% formaldehyde and painted with Chinese ink, to determine the state of the resection margins, an important prognostic factor directly related to the probability of tumour recurrence. The prostates were all included in paraffin.

In the histological study of the tumour as a whole, it was determined:

- *Degree of differentiation, according to the criteria described by Donald Gleason.*
- *Pattern 1 and 2 correspond to well differentiated tumours, almost similar to normal prostate glands, which are often nodular and well defined.*
- *A pattern 3 corresponds to a tumour with more imprecise borders composed of tumour glands whose size can be variable, from small to medium, even large, but usually separated from each other.*
- *Patterns 4 and 5 are patterns that imply a worse degree of differentiation and consequently a worse prognosis. In pattern 4 the tumour usually has imprecise borders and glands are often fused, poorly formed or cribriform. Pattern 5 is usually even more diffuse, arranged solid nest, sheets, cords, linear arrays or single cells.*

We established different categories as follows:

- *Group 1: those with homogeneous pattern 3 correspond to a score of Gleason 6 (3 + 3).*
- *Group 2: those showing a pattern combined with predominance of pattern 3 and a secondary pattern 4 (3 + 4), with or without third pattern 5*
- *Group 3: those that showed a pattern combined with predominance of pattern 4 and a secondary pattern 3 (4 + 3), with or without third pattern 5*
- *Group 4: poorly differentiated tumours with a Gleason equal to or greater than 8 (4 + 4), (4 + 5), (5 + 4), (5 + 5)*

Other morphological variables studied with a prognostic influence in the disease-free period are:

- *the extraprostatic extension (EEP) of the tumour*
- *the state of the surgical margins (MQ)*
- *invasion of the seminal vesicles (VS)*
- *the presence of vascular and / or lymphatic invasion*
- *perineural invasion was considered when the nerve fascicles were completely surrounded by tumour glands.*
- *the presence of high grade prostatic intraepithelial neoplasia (PIN)*
- *tumour location, bilateral, right or left*
- *tumour volume and approximate percentage of tumour size*
- *presence of intraductal carcinoma*
- *accompanying inflammatory infiltrate*

In the evolution of the disease, some of the patients developed distant exclusively bone metastases.

All patients underwent regular bilateral lymphadenectomy. Only two patients had lymph node metastases in a lymph node.

Selection of tissue for tissuemicroarrays

Subsequent to this evaluation, we selected 2-3 areas under optical microscopy for tissue samples for tissue microdissection, with a total of 555 tumour zones. Prostatic normal tissue, hyperplasic glands and PIN areas are also represented.

Immunohistochemical techniques

From the paraffin blocks, 3-micro sections were cut, using a microtome, one for haematoxylin-eosin to confirm the presence of tumour cells and five additional slides mounted on slide crystals, for subsequent dewaxing, hydration with xylol and alcohols in decreasing gradation (100°, 96°, 70°) and doubly distilled water. The slides properly placed on slides specially prepared for immunostaining had a previous process consisting of antigen recovery at high temperature in the presence of an EDTA buffer at pH 9 of Dako. After this antigenic recovery, the slides were incubated with the corresponding primary antibody and then with the polymers conjugated to appropriate anti-horse Ig and radish (Flex +, Dako). Visualization of the stained sections was performed with the chromogen 3,3'- diaminobenzidine. All these stains were run using the Dako Autostainer.

The antibodies used were MKP-1 sc-1102 (Santa Cruz Biotechnology); MKP-3 sc-377070 (Santa Cruz Biotechnology); JNK pAb, Rabbit, (pTPpY), (Promega); PHOP44/42MAPK (THR202 / TYR204) D13.14.4E 1674370S (Izasa); PHOSPHO-P38 MAPK (THR180 / TYR182) (D3F9) 1674511S (Izasa)

Assessment of immunohistochemical markers

Immunohistochemical staining was reviewed by two pathologists who were unaware of the clinical data, as well as of the tumour grade and the association between the cores of the different cases.

Expression of the kinase MKP-1 and phosphorylate p38 and JNK isoforms, were assessed in the nucleus; pERK were evaluated in nucleus and cytoplasm and MKP-3 in the cytoplasm of tumour cells. The results were compared with internal controls of the normal, hyperplasic glands and PIN areas.

To give a quantitative value to the expression of these markers, it was calculated using a semi-quantitative expression scale or Histo-score (H-score), which considers the percentage of cells with expression and intensity of expression. The intensity is evaluated in four categories, ranging from 0 to 3, with 0 being a negative value and 3 being an intense staining. The Histo-score is calculated by applying a correction factor to the percentage at each of the expression intensities, according to the following formula, with a result ranging from 0-300:

$$H\text{-score} = (\text{low expression } \%) \times 1 + (\text{intermediate expression } \%) \times 2 + (\text{strong expression } \%) \times 3$$

RESULTS

Clinical variables

- Age average at diagnosis was 64 years (range 45-74).
- PSA average value was 13,3 ng/ml (range 5,2-430).
- Clinical stage pT2c was more prevalent (20 cases, 25,6 %).
- 47 (53,4%) patients have biochemical recurrence of the disease
- No metastases were detected at diagnosis.

Morphological variables

- Gleason 6 was the most prevalent pattern (36 cases). Then Gleason 7 (3+4) with 19 cases, Gleason 7 (4+3) with 18 cases and Gleason equal to or greater than 8, 22 cases.
- 78,9 % of the tumours were bilateral.
- Extraprostatic extension was observed in 35 cases (36,8%), and almost all of them were focal affection.
- 31 cases had seminal vesicle invasion (32,6%).
- Lymph invasion were more frequent than vascular, 62 cases (65,3%) vs 30 cases (31,6%) respectively.
- Capsular invasion was identify in 91 cases (95,8%).
- Perineural invasion was present in 86 cases (90,5%).
- High-grade prostatic intraepithelial neoplasia was determined in 84,2% of the cases.
- Intraductal carcinoma was identified in 15 cases of high grade histology.
- 43 cases (45,3%) had positive surgical margins.
- Only two patients had lymph node metastases.

Of the 95 patients, four died for directly related to prostate cancer reasons.

Assessment of immunohistochemical markers

We demonstrated a statistical association with:

- The expression pattern of the phosphorylated isoform of ERK and MKP-3 phosphatase, correlates with the different Gleason categories.
- The low expression of the phosphorylated isoform of p38 and ERK is associated with a short disease free survival.
- The low expression of MKP-3 correlates with a short biochemical recurrence and it is associated with a short disease free survival.
- Low expression or loss of expression between the phosphorylated isoform of ERK with JNK and p38 correlates with short disease free survival.
- Low expression of MKP-3 is associated with a prostate cancer with progression to androgen independent phenotype.
- MKP-3 is over-expressed in PIN lesions.

MKP-1 was also part of our study, but we detected an unusual cytoplasmic stain without nuclear stain. That is in not described in current literature, so we decided not to consider these results.

CONCLUSIONS

1.-MKP-3 is a prognostic independent marker of the disease free survival.

2.-MKP-3 is over-expressed in initial stages of the disease conferring a protective role. Been intense in PIN lesion, with a decreasing loss of expression intensity in infiltrating tumours. This is associated with a reduced biochemical recurrence, a poor prognostic and a progression to a state of androgen independent.

3.-Loss of expression of pro-apoptotic kinase pp38 is associated with a short period of disease free survival.

4.-Androgen independent prostate carcinoma is associated with low expression of MKP-3 and low expression of pERK. This suggests that androgens receptors could be stimulated by other pathway different than MAPK.

5.-MKP-3 represents a potential interesting target to study for those patients with advanced disease or with an androgen independent phenotype, to which there are very limited treatment options.

6.-The cytoplasmic expression of MKP-1 without nuclear expression, supposes a not expected finding, For that reason, the interpretation of these results must be analysed and evaluated with caution, because in current literature, there are not similar results.

INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer de próstata.

1.1.1 Generalidades, definición y epidemiología.

El adenocarcinoma de próstata es un carcinoma invasivo compuesto por células epiteliales prostáticas neoplásicas con diferenciación secretora. Las glándulas se disponen en diferentes patrones morfológicos formando glándulas, cordones, células sueltas, estructuras cribiformes y sábanas, en que característicamente las células basales están ausentes.

El cáncer de próstata es actualmente la segunda neoplasia maligna más frecuente en la población masculina, con una estimación aproximada de 1,1 millón de nuevos casos al año en el 2012, según datos de la última publicación del libro de la OMS ¹. Existen diferencias geográficas bien demarcadas respecto a su distribución, siendo esta elevada en Norte América, el Caribe, Brasil, algunos países del oeste de Europa, Australia y Nueva Zelanda, y muy baja en Asia, África y Países de Oriente Medio (Figura 1).

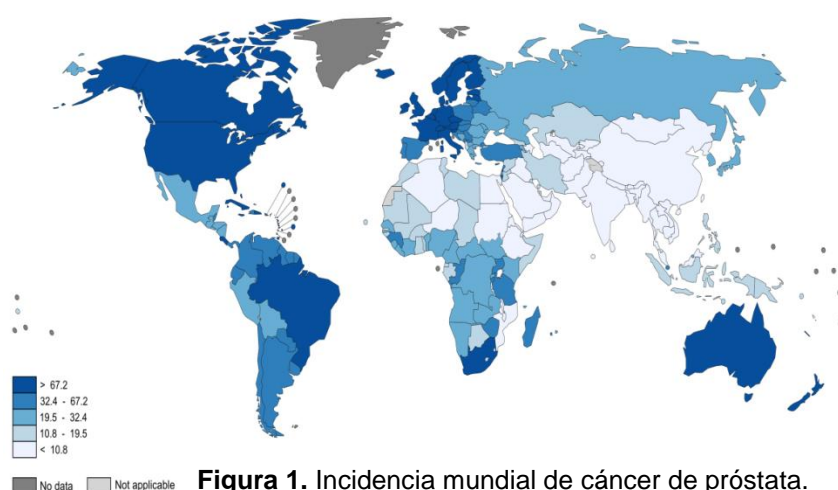


Figura 1. Incidencia mundial de cáncer de próstata.
Adaptado de Globocan. 2012. Ferlay.J. Int. J. Cancer.
2015 Mar ^{1,2}

La prevalencia de cáncer de próstata diagnosticado en autopsia es alta. Esta varía entre 15-20% en la población asiática y 30-40% en la población occidental ⁵. Existe una variación geográfica significativamente menor de la observada en la incidencia del diagnóstico clínico y las características étnicas son similares, y la prevalencia está directamente relacionada con la edad. En piezas de cistoprostatectomía en las que se incluye la próstata completa, se diagnostica incidentalmente cáncer de próstata en un 50% de estas piezas ⁴².

Desde la implementación del test de PSA como método de detección precoz y la mejora en los métodos de toma de biopsias con aguja a aumentado la incidencia del cáncer de próstata clínicamente diagnosticado. Los patólogos nos hemos encontrado en la obligada necesidad de revisar y modificar los criterios histológicos cualitativos y

cuantitativos, que hasta entonces utilizábamos para caracterizar a esas lesiones epiteliales prostáticas pequeñas y extremadamente prevalentes, que con frecuencia corresponden a focos de microcarcinoma ⁴.

Datos recientes indican que a partir de los 30 años se inicia la transformación maligna de las glándulas prostáticas y que el 20-25% de pacientes menores de 50 años tienen algún foco de cáncer en las glándulas ⁴.

La alta prevalencia reportada de cáncer subclínico según dos estudios comparativos en autopsias encontraron resultados similares en ambos. En ellos había pacientes que representaban poblaciones chinas, africanas y caucásicas. En todos no se encontró una relación del cáncer de próstata con la edad ni la etnia, los únicos datos relacionados fueron, el tamaño tumoral que aumentaba con la edad y que los tumores más pequeños se localizaban en la mitad externa de la glándula, este comportamiento era similar en todos los pacientes independientemente de la edad y raza ^{5,43}.

Es bien conocido que el estilo de vida y la dieta están íntimamente ligados al desarrollo de cáncer de próstata. Existe evidencia del daño que producen los carcinógenos contenidos en las dietas alimenticias y agentes oxidantes que producen inflamación crónica creando un medio adecuado que sienta las bases para el desarrollo del cáncer ⁶.

Estudios epidemiológicos han asociado la dieta con alto contenido de carne roja y grasas animales como factores de alto riesgo. Así como las comidas cocinadas a altas temperaturas y a la brasa, que dan resultado a la formación de aminas aromáticas heterocíclicas y carcinógenos hidrocarburos aromáticos policíclicos ⁷⁻⁹. En cambio otros alimentos como los ácidos grasos omega-3 de pescado, el licopene del tomate, la soja, los ácidos grasos de pescado, los crucíferos vegetales, como la coliflor y el brócoli parecen disminuir el riesgo ¹⁰.

Otros agentes asociados como factores de riesgos son el uso de hormonas sexuales esteroideas y los agentes infecciosos. En algunos modelos animales se ha visto la asociación de los efectos de estas hormonas, que inducen inflamación y lesión del epitelio prostático, con un potencial desarrollo de autoinmunidad ^{11,12}.

El daño epitelial y la inflamación subsiguiente, son los únicos hallazgos patogénicos que tienen en común los carcinógenos medioambientales y el desarrollo de cáncer de próstata. Debido a la agresión continua por estrés oxidativo, las células epiteliales preparan su defensa y supervivencia, induciendo la expresión de glutatión-S-transferasas y ciclooxigenasa 2 ¹³. Posterior a esto se produce el silenciamiento epigenético de los múltiples genes, incluido GSTP1, el cual se ha detectado, persiste a través de todas las fases de la progresión del cáncer. La atrofia proliferativa inflamatoria comparte muchas alteraciones genéticas y epigenéticas con la neoplasia intraepitelial prostática y cáncer de próstata ¹⁴.

La mayoría de los pacientes en los que se diagnostica cáncer de próstata son mayores de 60 años. Solo un 1% son menores de 50 años ³.

El cáncer de próstata es la quinta causa más frecuente de muerte en el mundo por malignidad en hombres, con una estimación de 307,000 muertes en el 2012 (Figura 2) según datos de la última publicación del libro de la OMS ². La mortalidad es más alta en poblaciones de raza negra de África subsahariana, el Caribe, negros americanos y Escandinavia. La menor tasa de mortalidad es en países de Asia, Países de Medio Oriente y Norte de África.

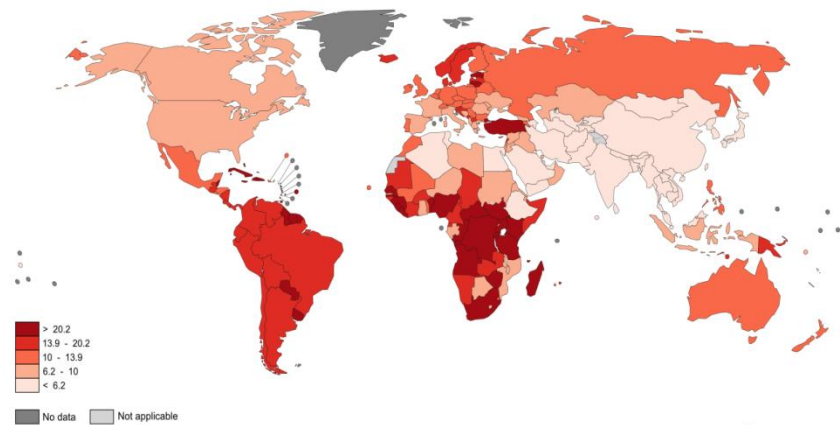


Figura 2. Mortalidad mundial de cáncer de próstata.
Adaptado de Globocan. 2012. Ferlay.J. Int. J. Cancer.
2015 Mar^{1,2}

El adenocarcinoma de próstata puede ser sospechado por niveles elevados de antígeno prostático específico en sangre (PSA) o por un tacto rectal anormal. El tacto rectal no es particularmente sensitivo ni específico ya que no detecta hasta el 25-50% de los cánceres de próstata detectados mediante PSA sérico ¹⁵. Los adenocarcinoma de próstata detectados mediante el tacto rectal suelen ser tumores de gran tamaño y alto grado, que suelen tener extensión extraprostática microscópica ⁴⁴.

En aquellos países donde están establecidos los programas de detección precoz con PSA, el cáncer de próstata suele ser asintomático al diagnóstico. Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la enfermedad localmente avanzada suelen ser la dificultad de la micción, retención urinaria aguda y hematuria. Las metástasis se producen de forma tardía en la enfermedad localmente muy avanzada.

1.1.2 El PSA como método de detección precoz

El antígeno prostático específico (PSA) es una proteasa serina de la familia de las calicreinas que se produce en las células secretoras de los acinos y ductos prostáticos ⁴⁵. Esta es secretada del fluido seminal a la sangre donde es detectado en el suero.

Los niveles de PSA en suero tienen una fuerte correlación con el riesgo de padecer cáncer de próstata ^{46,47}. Junto con otros factores clínicos como, la edad del paciente, la raza y la historia familiar, así como el resultado del estudio del tacto rectal, sirve para determinar la necesidad de realizar una biopsia al paciente.

El valor normal del PSA oscila entre 2-4 ng/ml ⁴⁶. Existe una variación biológica importante de 20-30% entre individuos, que también puede verse influida por situaciones clínicas que producen su elevación, como la inflamación e hiperplasia prostática benigna, o posterior a la manipulación la glándula mediante el tacto rectal ⁴⁸. Valores de PSA <1 ng/ml tiene un riesgo muy bajo de padecer cáncer ⁴⁶.

Se han realizado múltiples estudios en busca de biomarcadores específicos en sangre que tengan alta especificidad para detectar el cáncer de próstata, sin embargo el antígeno prostático específico (PSA) es el único marcador sanguíneo utilizado rutinariamente en la actualidad.

La utilización del PSA ha contribuido a la disminución de la prevalencia del cáncer de próstata con un impacto mucho más pronunciado en pacientes mayores de 70 años y aumentado 50% el diagnóstico el diagnóstico de carcinoma subclínico. Así como el diagnóstico de tumores en estadios más tempranos y Gleason más bajos ⁴⁶

Nuevos avances en el siglo XXI han abierto nuevas vías de estudio para la comprensión de esta neoplasia, cuya incidencia cada vez es mayor en todo el mundo, quizás debido a la implementación del antígeno prostático específico (PSA) como herramienta de detección precoz. Si bien, la utilización masiva en las últimas dos décadas de la determinación de PSA como método de detección precoz parece tener un beneficio en el diagnóstico del cáncer solo a largo plazo, actualmente varios estudios parecen no encontrar beneficio alguno en su utilización ^{49,50}.

1.1.3 Métodos de imagen

El ultrasonido transrectal es la técnica de elección en el abordaje diagnóstico ante la sospecha clínica de cáncer de próstata. A pesar de sus limitaciones, la biopsia guiada por ultrasonido transrectal ha mejorado de forma significativa el número de casos diagnosticados de cáncer de próstata ⁵¹. Si bien este tiene limitaciones para el estadiaje local, debido a su baja sensibilidad y especificidad en determinar la extensión extraprostática (EEP) ^{52,53}.

La biopsia realizada por ultrasonido transrectal con contraste ha demostrado tener un mejor beneficio en la toma de biopsias para la detección de carcinoma de próstata con Gleason de alto grado y volumen elevado (>50%) ⁵⁴.

La resonancia magnética es una modalidad de imagen no invasiva para el cáncer de próstata localizado, que puede determinar su tamaño y estimar su extensión ⁵⁵. Es útil para obtener con mayor precisión tejido de los nódulos sospechosos, disminuyendo así el número de casos falsos negativos, producto de muestreos al azar obtenidos hasta ahora mediante ecografía transrectal.

1.1.4 Cáncer de próstata. Recuerdo histórico y actualizaciones en las distintas categorías

Donald Gleason desarrolló en la década de 1960 un sistema de gradación patológica para el adenocarcinoma prostático, pero no fue hasta 1990 cuando éste sistema, tras un amplio consenso en Norte América, fue aceptado ampliamente en todo el mundo.

El sistema de gradación de Gleason está basado en el patrón arquitectural de las glándulas neoplásicas individuales a bajo aumento. Este sistema asigna cinco patrones mayores, en una escala del 1 al 5 (tumor bien diferenciado a pobremente diferenciado), al patrón glandular primario (dominante) y al secundario (segundo más prevalente). Estos dos grados se suman para obtener un valor que varía entre 2 (1+1) y 10 (5+5): “cuanto mayor es el valor, menor el grado diferenciación, lo que conlleva un peor pronóstico a largo plazo” (Figura 3).

Desde su introducción este sistema, ampliamente aceptado en todo el mundo actualmente, ha sido utilizado y los estudios realizados durante todos estos años sustentan la utilidad y reproducibilidad de las distintas categorías, que guardan una relación directa entre el grado de diferenciación y el pronóstico a largo plazo.

Éste sistema de gradación morfológico fue creado con la finalidad de proporcionar información fundamental que permita estratificar grupos de pacientes y así poder determinar el manejo y tratamiento para cada uno de ellos.

Si bien Gleason en una de sus publicaciones contemplaba la presencia de un tercer patrón, el valor pronóstico de éste a largo plazo no fue estudiado en ese momento. Aunque en los tumores peor diferenciados (score de Gleason mayor o igual a 8), es probable que este tercer patrón carezca de un significado pronóstico destacable, parece posible que para los tumores mejor diferenciados, Gleason 6 (3+3) y un tercer patrón de alto grado (4 o 5), y en aquellos casos con un Gleason 7 (3+4) o (4+3) y un tercer patrón 5, este tercer patrón pudiera modificar el pronóstico a largo plazo, aumentando la probabilidad de recidiva de la enfermedad y/o desarrollo de metástasis, a diferencia de aquellos casos en que no se identifican este tercer patrón ⁵⁶.

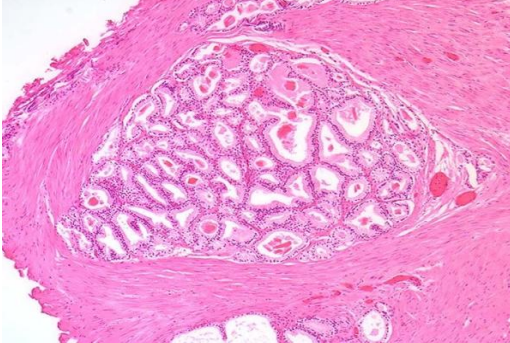
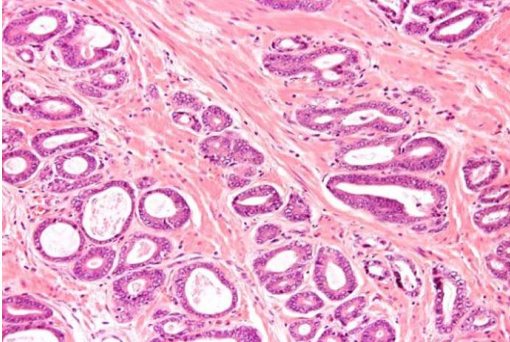
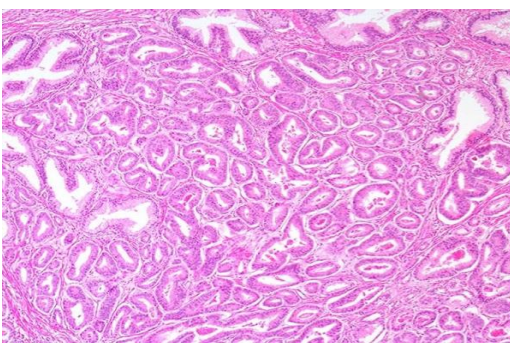
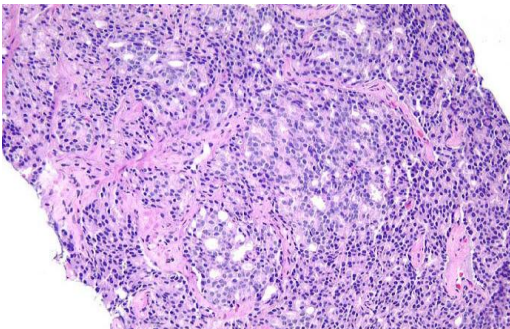
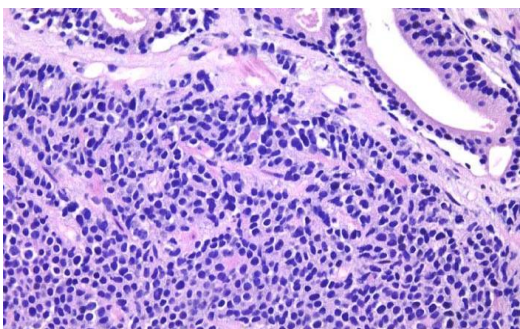
Después de muchos años utilizando este sistema útil y extrapolable a toda la población masculina independientemente de sus etnias y en el que se han ido introduciendo modificaciones a través de los años, basadas en la valoración morfológica y estratificación clínica de los grupos morfológicos ya conocidos, estas han reforzado el valor de este sistema de gradación.

Estudios recientes han demostrado la veracidad de esta hipótesis, que la presencia de un tercer patrón de alto (patrón 4 y 5 de Gleason) tanto en piezas de prostatectomía radical como en biopsias por aguja, es un predictor independiente de progresión de la enfermedad y conlleva un periodo libre de enfermedad más corto (progresión del PSA), recidiva tumoral y/o desarrollo de metástasis, mayor aún en aquellos pacientes con tumores moderadamente diferenciados, por lo que la existencia de focos que representen entre 1-5 % de estos patrones deben ser reflejados en los informes anatomopatológicos, de cara a los posibles tratamientos actuales y futuros a los que estos pacientes puedan recibir, y así reducir la tasa de recidivas ^{56,57}.

La última publicación del libro de la Organización Mundial de la Salud (OMS), hace referencia a este tercer patrón de alto grado que comentaremos más adelante.

Otra publicación reciente, en la que se han estratificado las diferentes categorías de los grupos del Gleason en grupos de riesgo pronóstico, ha demostrado tener una importancia pronóstica en manejo terapéutico de las distintas categorías. Estos grupos de riesgo pronóstico están categorizados del 1 al 5, siendo el grupo 1 aquellos pacientes con un score de Gleason de 6 (3+3), el grupo 2 los Gleason 7 (3+4), el grupo 3 los Gleason 7 (4+3), el grupo 4 los Gleason 8 (4+4) y en el grupo 5 aquellos con Gleason 9-10. La estratificación de estos grupos de riesgo pronóstico tiene al parecer una importancia vital en el manejo terapéutico más individualizado y seguimiento a largo plazo ⁵⁸

Figura 3. Diferentes patrones morfológicos según los criterios de Gleason (Adaptado de The Johns Hopkins University. All rights reserved. Jonathan Epstein, M.D. Copyright 2013⁵⁹)

<p>Patrón de Gleason 2 Score de Gleason 4 (2+2) Nódulo bien delimitado compuesto por glándulas de tamaño y forma uniforme</p>	
<p>Patrón de Gleason 3 Score de Gleason 6 (3+3) Glándulas bien formadas que dispones en hileras, pero separadas entre sí por abundante estroma. Se reconoce la atipia citológica, con nucléolo visible a bajo aumento.</p>	
<p>Patrón de Gleason 3 Score de Gleason 6 (3+3) Glándulas bien formadas, muy agrupadas, pero separadas entre sí. No se observa fusión glandular.</p>	
<p>Patrón de Gleason 4 Score de Gleason 8 (4+4) Glándulas predominantemente fusionadas de extenso patrón cribiforme.</p>	
<p>Patrón de Gleason 5 Score de Gleason 10 (5+5) Patrón de crecimiento sólido. No se reconocen glándulas.</p>	

1.1.5 Tipos de tejido para diagnóstico

Las biopsias de cilindro con aguja son el tipo de muestra mayormente utilizada, que se obtiene mediante ultrasonido transrectal con aguja de 18G. Se suelen obtener entre 10-12 cilindros y algunos cilindros adicionales de nódulos sospechosos ¹⁶.

La biopsia de saturación consiste en la obtención de más de 20 cilindros cuando la sospecha de cáncer persiste a pesar de biopsias previas negativas.

Estos cilindros deben ser incluidos de forma separada en capsulas de parafina para su adecuado procesamiento para luego realizar cortes a 3 micras de grosor al menos de 3 niveles para hematoxilina-eosina ^{16,60}, de esta forma reduciremos las posibilidades de no diagnosticar un microcarcinoma.

El diagnostico incidental de carcinoma de próstata en material procedente de cirugías de resección transuretral puede variar entre el 5-8% según las series ^{17,18} y en piezas de prostatectomía simple abierta (enucleación) por hiperplasia prostática benigna de 4,5% ^{16,19}.

La prostatectomía radical es tratamiento definitivo para carcinoma de próstata clínicamente localizado, que puede ser realizada de forma abierta, laparoscópica o por cirugía robótica.

La pieza de prostatectomía debe ser pesada con y sin las vesículas seminales, medida en todas sus dimensiones y tintada con dos colores para determinar el lado derecho e izquierdo. Posterior a esto se debe fijar en formol al 10% por 24 horas. Los márgenes del ápex y base deben ser separados y cortados en el plano parasagital para ser evaluados por separado. Una vez fijada la pieza se realizan cortes de 3-4 mm de espesor a través del plano perpendicular a la superficie rectal. Se pueden incluir en macrobloques o en bloques convencionales según el protocolo de tallado establecido en cada centro. Las vesículas seminales también se deben incluir, y un corte representativo de la zona de transición entre la base prostática, tejido conectivo y las vesículas seminales. Si además se ha hecho linfadenectomía estos ganglios se incluyen también.

La pieza de prostatectomía se incluye en su totalidad. Una vez hechos los bloques, son procesados y teñidos con hematoxilina eosina. Siguiendo este protocolo somos capaces de diagnosticar el 98% de los cáncer de próstata con Gleason ≥ 7 , 100% de los márgenes positivos y 96% de los casos con extensión extraprostática ⁶¹.

1.1.6 Características histopatológicas y comportamiento biológico

La mayoría de los cánceres de próstata son multifocales, con un promedio de 2-3 nódulos separados por glándula. La mayoría de los casos (75-80%) están localizados en la zona posterior/posterolateral periférica, si bien con los métodos de imagen diagnósticos actuales y el PSA sérico, está aumentado el número de casos de tumores más profundos órgano confinados no palpables ²⁰.

En los últimos años parece haber cierto cambio en la localización topográfica de la localización. Se están diagnosticando tumores en la zona anterior periférica y transicional, con afectación del estroma fibromuscular anterior. La localización central es excepcional y con frecuencia suele ser por extensión de un tumor periférico o ser primario, en cuyo caso son de bajo grado histológico.

Los criterios morfológicos para el diagnóstico del cáncer de próstata se basan en una serie de características arquitecturales, nucleares y citoplásmicas.

Las características arquitecturas son variadas y dependen del grado de diferenciación del tumor, lo cual expondremos más adelante. En tumores bien diferenciados las glándulas malignas se disponen en forma de hilera de pequeñas glándulas atípicas que expanden la anchura del cilindro o como un grupo pequeño de glándulas atípicas a ambos lados de una glándula de características benignas.

Respecto a las características nucleares, el dato más relevante es que las células de adenocarcinoma muestran un nucléolo prominente. Pero hay adenocarcinomas de bajo grado (Gleason 4 y 5), de células espumosas y de células transicionales que pueden tener un nucléolo muy pequeño o no tenerlo. La presencia de múltiples nucléolos o un nucléolo periférico no debe ser valorado. Las figuras de mitosis es más frecuente encontrarlas en piezas de prostatectomía que en biopsias y en tumores de alto grado que en adenocarcinomas bien diferenciados ^{21,22}. Los cuerpos apoptóticos son con mayor frecuencia observados en focos de carcinoma y neoplasia intraepitelial prostática hasta en el 13% y excepcionalmente en el tejido normal.

Los cambios en el citoplasma de las células de adenocarcinoma también pueden ser útiles en el diagnóstico de malignidad. El citoplasma suele ser más amfófilo comparado con el citoplasma claro y pálido de las glándulas normales que le rodean ²¹.

Hay tres rasgos característicos del adenocarcinoma que no tienen las glándulas normales: la fibroplasia mucinosa, las glomerulaciones y la invasión perineural ⁶². Otras características no menos importantes, pero si menos frecuentes son la presencia de contenidos intraluminales y la respuesta del estroma al tumor.

Los cristaloides prostáticos son estructuras eosinófilas densas que se disponen en formas geométricas diversas, pero no son exclusivas del cáncer pues pueden estar presentes en la adenosis glandular, incluso en glándulas normales. En ocasiones podemos encontrar secreciones luminales en las glándulas neoplásicas de tipo material mucinoso azul o secreción amorfa rosada acelular ²¹.

En el cáncer de próstata a diferencia de otros tumores no se produce una desmoplasia llamativa, pero si hay algo de reacción estromal, excepto en tumores de alto grado ⁶³. Respecto a la respuesta inflamatoria se dice que suele ser escasa o estar ausente.

1.1.7 El papel que desempeñan las técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas IHQ son herramientas diagnósticas útiles que deben ser valoradas en un contexto morfológico acorde.

Si bien en las últimas décadas el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas inmunohistoquímicas nos han permitido avanzar en el diagnóstico del cáncer de próstata, sobre todo en casos dudosos en los tumores bien diferenciados o escasamente representados, que nos ayudan a diferenciar el epitelio neoplásico de las glándulas prostáticas normales ⁶⁴.

A veces nos encontramos en situaciones en las que estas técnicas son de gran ayuda para determinar si se trata de un tumor primario de la glándula o una infiltración por contigüidad de una neoplasia primaria de un órgano adyacente. Tal es el caso de adenocarcinomas mínimos, diagnosticados mediante biopsia de aguja en los que hay pocas glándulas y demostrando la ausencia de células basales podemos sugerir un diagnóstico de sospecha de malignidad para un seguimiento más estrecho del paciente. También para diferenciar un adenocarcinoma prostático pobremente diferenciado de un carcinoma urotelial, y a veces para discriminar entre un adenocarcinoma de alto grado y una infiltración por adenocarcinoma de vejiga o de colon ⁶⁴.

Estas son de gran utilidad en la confirmación del diagnóstico de adenocarcinoma mínimo o limitado (que mide <1 mm y afecta < 5% del tejido del cilindro).

Los anticuerpos comúnmente utilizados pueden ser una combinación de citoqueratinas de alto peso molecular *34β12*, *p63* y *p40*, para determinar la presencia de células basales, normalmente presentes en las glándulas prostáticas normales, y ausentes en las glándulas neoplásicas, por lo que la tinción debe ser negativa en los casos de adenocarcinoma. Estos son anticuerpos con una alta sensibilidad y especificidad, pero pueden ser negativos en atrofia glandular, particularmente atrofia parcial, condiciones benignas pseudohiperplásicas y algunas adenosis ^{65,66}.

Estas citoqueratinas pueden combinarse con otros anticuerpos como la *Alfa-methylacyl-CoA-racemasa (AMACR)*, positivo en gran parte de los cánceres de próstata con una expresión granular citoplásmica en las células neoplásicas. Tiene una sensibilidad próxima al 80%, sin embargo hay variantes morfológicas que no lo expresan como el carcinoma pseudohiperplásico y el carcinoma de células espumosas, además de ser expresado en otros adenocarcinomas y carcinoma renal. También puede ser positiva en la neoplasia intraepitelial prostática (PIN), incluso en algunos casos de atrofia glandular y adenosis, por lo que todas estas técnicas deben ser valoradas con cautela ⁶⁷⁻⁶⁹.

Respecto al papel que pueden desempeñar estas técnicas como marcadores pronósticos, recientemente la calicleína humana tipo 2 (*human kallikrein type 2/hK2*), cuya expresión está aumentada, débilmente en células hiperplásicas hasta intensa en las glándulas neoplásicas, similar a la calicleína 3 (*KLK3*) conocida como PSA. Ambas están relacionadas con un pronóstico adverso, pero no ha demostrado ser un factor pronóstico independiente de la recidiva bioquímica de PSA, después de la prostatectomía radical ^{70,71}.

El antígeno prostático específico de membrana (PSAM) también ha sido estudiado. Este está sobre-expresado en el tejido neoplásico de forma independiente a la recurrencia bioquímica del PSA ⁷² por lo que tiene valor diagnóstico.

El papel de la proteína Ki67 como marcador pronóstico, es bien conocido en un gran número de tumores, incluido el cáncer de próstata, si bien actualmente no se utiliza de rutina.

La sobre-expresión de receptores de andrógenos juega un papel importante en la progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer de próstata resistentes al tratamiento, que han sido tratados mediante castración. La sobreexpresión de receptores de andrógenos se correlaciona con la expresión alta de Ki67 y ha demostrado ser un factor pronóstico independiente en el periodo libre de recurrencia bioquímica.

1.1.8 Gradación del cáncer de próstata. Nuevas modificaciones en el sistema de gradación

Como mencionamos anteriormente fue Donald Gleason quien desarrolló este sistema de gradación patológica para el adenocarcinoma prostático en la década de 1960.

El sistema de gradación de Gleason está basado en el patrón arquitectural de las glándulas neoplásicas individuales a bajo aumento. Este sistema asigna cinco patrones mayores, en una escala del 1 al 5 (tumor bien diferenciado a pobremente diferenciado), al patrón glandular primario (dominante) y al secundario (segundo más prevalente). Estos dos grados se suman para obtener un valor que varía entre 2 (1+1) y 10 (5+5): cuanto mayor es el valor, menor el grado diferenciación. Esto debe ser valorado y diagnosticado con el objetivo de 10x y solo debe utilizarse el objetivo de 20x para confirmación ⁷³.

Actualmente los tumores con grados de Gleason 2-5 no se reportan en la biopsias de cilindro, ya que tienen poca reproducibilidad y poca correlación con el grado observado en la pieza de prostatectomía, en las que se suelen diagnosticar grados de Gleason mayor al diagnosticado en la biopsia ⁷⁴.

En la última conferencia para el consenso de gradación de los tumores de próstata de la OMS 2014/Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) (Figura 4) ⁷⁵. Las nuevas modificaciones incluyen la redefinición del patrón glomeruloide, como una variante de glándulas cribiformes considerado como patrón 4, entre otras.

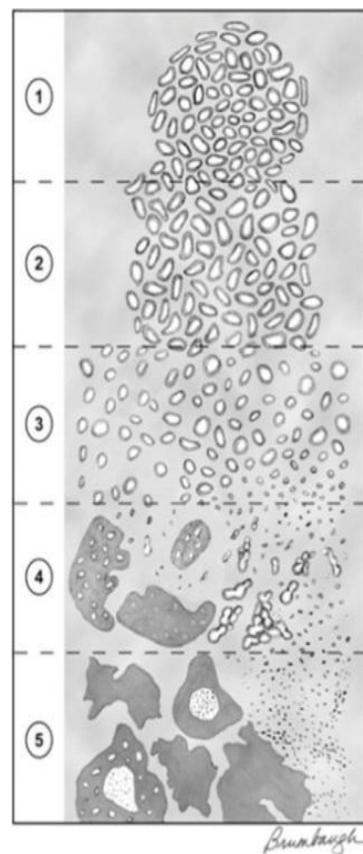
En referencia a las reglas de cómo se deben gradar estos tumores, depende del tipo de muestra ⁷³:

- *En la situación de un carcinoma de alto grado en biopsia de aguja o prostatectomía radical, el patrón de bajo grado debe ser ignorado si ocupa <5% del área del tumor.*

- En la situación de dos patrones en la biopsia de aguja, el de mayor grado debe estar incluido en el Gleason indistintamente de su cantidad.
- En piezas de prostatectomía a cada nódulo le debe ser asignado un grado de Gleason por separado, excepto, aquellos nódulos múltiples de bajo grado.
- Tumores de Gleason 7 (4+3) que tienen >5% de patrón 5 en un nódulo, este debe ser asignado como el patrón secundario, es decir, Gleason 9 (4+5).
- Tumores de Gleason de 7 ya sea en biopsia o en pieza de prostatectomía, se recomienda dar el porcentaje de patrón 4 ya que puede tener implicaciones en el manejo del paciente y supervivencia activa.
- En las biopsias de cilindro cada biopsia de cilindro debe ser informada de forma separada, especificando la localización, además de un escore global.



Dibujo original de Donald Gleason



Score de Gleason modificado según el consenso la ISUP 2015

Figura 4. Evolución de los de Gleason 1996-2015. Adaptado de Humpath.com

Las variantes histológicas que pueden ser de importancia debido a que algunas tienen mal pronóstico, como el adenocarcinoma de células en anillo de sello, el carcinoma pleomórfico de células gigantes y la variante sarcomatoide. Otras variantes que son importantes pero más bien por la dificultad diagnóstica debido a que son excepcionales son el adenocarcinoma atrófico, de células espumosas, de tipo ductal, el microquístico, pseudohiperplásico y mucinoso ⁷⁶. Hay variantes de carcinoma que no deben ser gradadas con el score de Gleason como el carcinoma adenoescamoso, el carcinoma epidermoide, carcinoma adenoide quístico y basaloide, el tipo linfopitelioma, el neuroendocrino de célula pequeña y el carcinoma de células transicionales ⁷⁷.

Algunos de los cambios morfológicos postratamiento secundarios a la radioterapia son similares a los que podemos ver en otros órganos. La atrofia glandular y fibrosis cicatricial estromal, además de cambios en el epitelio, como hiperplasia de células basales y atipia reactiva en células epiteliales benignas. Las células neoplásicas residuales suelen ser pequeñas de citoplasmas vacuolados, con núcleo y nucléolo pequeños, pero estos hallazgos no son siempre reproducibles ⁷⁸⁻⁸⁰.

Los cambios post-neoadyuvancia que podemos encontrar en la próstata son atrofia difusa con hiperplasia de células basales, metaplasia escamosa inmadura y metaplasia urotelial. Los cambios morfológicos pueden ser variables desde muy sutiles a extensos, que pueden ser parecidos a los observados a los efectos por radiación, o en casos específicos como el tratamiento con dietilestilbestrol que muestra metaplasia escamosa glucogenizada ^{81,82}.

Aun no hay biomarcadores de tejido predictores de respuesta a la terapia hormonal y no es recomendable gradar en cáncer de próstata después de haber recibido terapia hormonal.

1.1.9 Factores pronósticos y predictivos en cáncer de próstata

El factor pronóstico y predictivo basado en muestras de tejido más importante es el grado de Gleason. El grado de Gleason en la biopsia sirve para predecir los hallazgos histológicos en la pieza de prostatectomía, el estadio postoperatorio, estimar el riesgo de progresión de la enfermedad con o sin tratamiento con intención curativa y la mortalidad específica asociada al cáncer ²³⁻²⁵.

Después del grado de Gleason, el estadio patológico en la pieza de prostatectomía es el factor pronóstico más importante para predecir recurrencia y mortalidad específica ²⁶.

En un análisis multivariante, la extensión extraprostática resultó ser un predictor significativo independiente de la recurrencia bioquímica ²⁷.

La invasión de las vesículas seminales es otro factor determinante de la supervivencia específica después de prostatectomía, al igual que el grado de Gleason ⁸³. Se observa en 3,3-7,6% de los piezas y constituye un factor pronóstico adverso, con un

periodo de recurrencia libre de enfermedad a 5 años de 36,1-45%⁸⁴ y recurrencia bioquímica del PSA a 10 años entre 19-28%⁸⁵.

El estado del margen quirúrgico es un predictor de la recurrencia bioquímica. La extensión del margen quirúrgico afecto se correlaciona con la evolución y el grado de Gleason, y es un predictor independiente de la recurrencia en muchas series^{28,29}.

Las invasiones linfovasculares se pueden ver entre el 5-53% de la piezas de prostatectomía radical. Según algunos estudios es un factor predictivo independiente de la evolución, sin embargo no hay mucha homogeneidad entre los resultados³⁰.

El tamaño tumoral es de importancia pronóstica pero no se ha establecido como un factor predictor independiente³¹. La invasión perineural se observa en 90% de las piezas y con dificultad en las biopsias, actualmente carece de valor predictivo en la evolución de la enfermedad por lo que no es obligatorio reflejarlo en los informes³².

1.2 Alteraciones genéticas en cáncer de próstata

Recientemente se ha podido estudiar el primer genoma completo de secuenciación que muestra reordenamientos complejos^{33,34}.

Como todos los cánceres, el cáncer de próstata también se desarrolla por un desequilibrio en la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores tumorales.

Las alteraciones en genes encontrados en cáncer de próstata esporádico comprenden las vías de PI3K, Myc y p53. Las lesiones en la vía de PI3K ocurren en el 25-70% de los cánceres de próstata y cáncer metastásico³⁵ (Figura 5).

Deleciones genómicas y mutaciones puntuales inactivantes en PTEN (10q23), un gen supresor tumoral, se producen en el 50% de los cánceres de próstata y son aún más prevalente en la enfermedad avanzada³⁴⁻³⁹.

La amplificación del gen MYC, promotor del ciclo celular, que codifica el factor de transcripción Myc, también está presente en el cáncer de próstata³⁷⁻³⁹.

Estudios recientes han demostrado la presencia de deleciones y mutaciones puntuales en el locus del gen supresor tumoral p53 en el 70% de los cánceres de próstata y fundamentalmente en las metástasis³⁷⁻³⁹.

La proteína del retinoblastoma (RB) es un supresor tumoral clásico, que activa verificando la progresión del ciclo celular, y con frecuencia esta mutado en múltiples cánceres. RB1 rara vez se asocia a cáncer de próstata localizado, si bien esta con frecuencia inactivado hasta en 45% de los carcinoma de próstata hormono-resistentes³⁷⁻³⁹.

Los receptores de andrógenos son factores de transcripción nuclear dependientes de ligandos y constituyen una vía de señalización crítica, así como la principal diana

terapéutica en cáncer de próstata. Las alteraciones encontradas se restringen a carcinomas metastásicos hormono-resistentes ^{86,87}, pueden ser amplificación de genes en un 40-50% y mutaciones puntuales en el 10%, que están ausentes en el carcinoma clínicamente localizado ³⁵.

La fusión de genes recurrentes de los factores de transcripción oncogénicos de miembros de la familia ETS, siendo la fusión de TMPRSS2-ERG la más común, con una prevalencia de 27-79% ⁸⁸.

El gen SPOP codifica el componente para el reconocimiento del sustrato, el complejo ubiquitina ligasa E3 cullin 3. Mutaciones de SPOP se han descrito recientemente en cáncer de próstata. Siendo estas las mutaciones puntuales más frecuentes en cáncer de próstata en el 5-15% de múltiples cohortes independientes ^{35,89}.

CHD1 (5q21) codifica la helicasa con cromodominio de unión a ADN 1, que actúa remodelando la cromatina y regula la transcripción a través del genoma. Se han descritos deleciones recurrentes en el 10-25% de los cánceres primarios de próstata, tumores metastásicos y con frecuencia asociadas a mutaciones en SPOP ^{33,35,39}.

Datos recientes del programa Atlas del Genoma del Cáncer (The Cancer Genome Atlas/TCGA) sugieren que el cáncer de próstata localizado puede dividirse en dos clases mayores. El cáncer de próstata con alteraciones con reordenamiento-ETS, el cual tiene muchas lesiones en las vías de señalización de PI3K y p53, y los carcinomas con alteraciones en SPOP/CHD1. ⁹⁰

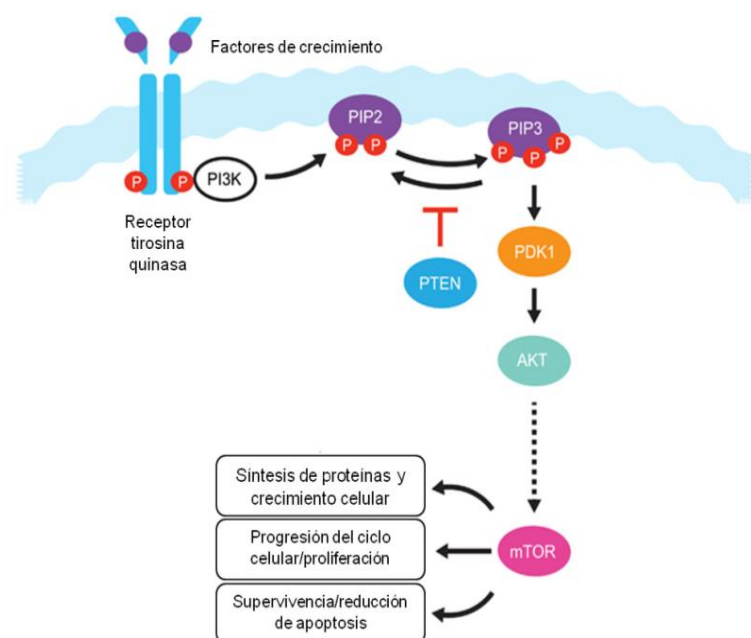


Figura 5. Vía de señalización de PI3K/PTEN/AKT. Adaptado de Phin S. Moore. Front Oncol, 2013

1.3 Vía de señalización de transducción de proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases, MAPK)

1.3.1 MAPK quinasas y su relación en los procesos celulares

La familia de las MAPK quinasas está constituida por un grupo altamente conservado de módulos de quinasas que regulan e intervienen en una variedad de procesos fisiológicos, que transmiten señales a través de receptores de membrana extracelulares a efectores específicos que controlan diversos procesos celulares tales como la proliferación, diferenciación, desarrollo, respuestas a estímulos de estrés, adhesividad celular, capacidad de migración y apoptosis celular^{40,91-94}.

Diversos estímulos producen la activación de las MAPK e incluyen factores de crecimiento, citoquinas, integrinas de unión o situaciones de estrés⁹⁵.

Se han caracterizado tres grupos mayores basados en la similitud de sus secuencias, activación por diferentes agonistas y especificidad del sustrato. Estas tres clases de MAPK son, la quinasa reguladora de la señal extracelular p42 y p44 MAPK (extracelular signal-regulated kinases o ERK1/2), la quinasa con extremo amino-terminal c-Jun (c-Jun amino-terminal kinasa, JNK) y p38 MAPK con sus isoformas (α , β , δ , γ)⁹⁶.

Las MAPK son activadas mediante fosforilación de los residuos de treonina y tirosina, el segmento conservado T-X-Y dentro del asa de activación de la quinasa y esto es mediado por una MAPK quinasa específica dual (MKK o MEK), que a su vez es fosforilada en sus residuos serina/treonina por una MAPK quinasa quinasa (MKKK o MEKK)^{92,97,98}. Estas quinasas pueden actuar de forma secuencial, pero también pueden formar parte de otros complejos de señales interactuando con proteínas de ensamblaje⁹⁹.

A medida que crece nuestro conocimiento acerca de la base bioquímica y estructural de estas enzimas MAPK, así como la comprensión de su catálisis y especificidad del sustrato, estamos avanzando en la comprensión del papel que desempeñan estas enzimas en los procesos fisiológicos de las células y tejidos en los mamíferos.

Estas MAPK están ampliamente distribuidas en todos los tejidos de mamíferos y debido al papel fundamental que desempeñan en los procesos celulares, la presencia de alteraciones en cualquiera de las vías de señalización en las que intervienen, han sido relacionadas con un amplio grupo de neoplasias malignas, y por lo tanto podrían estar involucradas de forma directa o indirecta en la génesis del cáncer⁹⁶. La señalización anormal de MAPK parece tener consecuencias importantes en el desarrollo y progresión del cáncer en humanos y también juega un papel determinante en la respuesta tumoral a terapias convencionales contra el cáncer.

El control de la magnitud y duración de la activación de estas MAPK, así como los mecanismos de regulación negativa (feedback), dependen de las propias MAPK, mediante la intervención de las proteínas fosfatasa.

Las actividades de ERK, p38 MAPK y JNK están reguladas por diferentes cascadas de MAPK, que proporcionan un enlace entre las señales transmembranas y cambios en la transcripción, ambas activadas en respuesta a diferentes señales medio-ambientales y del desarrollo¹⁰⁰. Y dependiendo del tipo celular, una cascada de MAPK en particular puede estar involucrada en diferentes respuestas celulares dentro de la misma célula.

1.3.2 Vía de transducción de ERK1/2 (proteína quinasa reguladora de la señal extracelular)

ERK1/2 tiene un papel central en la proliferación celular. Las consecuencias biológicas de la fosforilación de los sustratos de ERK1/2 son un aumento de la proliferación celular, diferenciación celular, supervivencia, angiogénesis, motilidad y capacidad de invadir¹⁰¹.

La familia de ERK comprende 6 isoformas, ERK1-5 y ERK 7/8. Las más estudiadas ERK1 (p44) y ERK2 (p42) comparten más del 85% de identidad de aminoácidos y representa un punto de convergencia para señales mitógenas de diversas vías. Ambas están distribuidas uniformemente, pero su abundancia en los tejidos varía. ERK5, una proteína quinasa nuclear y citoplásmica, está relacionada con la regulación de respuestas inmunes innatas y adaptativas⁴¹.

Tras el estímulo por mitógenos y citoquinas se inicia la señal de transducción de ERK1/2, a través de un receptor tirosina quinasa, Ras-monomérica GTPasa y un receptor de hormona esteroidea de activación no-nuclear, distribuidos en la membrana plasmática subcelular, que interactúa con el módulo de señalización Raf/MEK/ERK, en que B-Raf parece ser la forma dominante de las isoformas de Raf. A través de la acción de MEK se produce la traslocación de ERK al núcleo, aumentando su actividad catalítica primordialmente relacionada a proteínas de crecimiento dentro del núcleo¹⁰².

Una vez activado ERK1/2 la actividad catalítica aumenta de forma exponencial y podría tener al menos 160 efectores potenciales en el citoplasma y núcleo de la célula, teniendo como diana proteínas del citoesqueleto, quinasas, fosfatasa, factores de transcripción y proteínas relacionadas con la apoptosis¹⁰².

La respuesta a la activación de ERK va a depender primordialmente de la combinación entre la intensidad y duración del estímulo, que va a determinar diferentes respuestas dependiendo del tipo de célula y del estímulo. Un estímulo bajo y sostenido se asocia a proliferación celular, y a pesar que generalmente se le asocia a esta respuesta, numerosos estudios han demostrado que un estímulo fuerte y sostenido produce un efecto contrario, senescencia y apoptosis¹⁰³. Esto último se podría explicar por lo que sabemos acerca de p53. El daño del DNA de baja intensidad activa ERK produciendo arresto celular, en cambio un daño extenso del DNA activa ERK causando apoptosis¹⁰⁴.

El significado de la señalización de ERK1/2 en la biología del cáncer fue descrita por primera vez cuando se identificó la proteína Ras como el componente de

transformación del virus oncogénico para K-Ras y H-Ras ¹⁰⁵. Se han encontrado mutaciones de Ras en más del 30% de los cánceres. Las proteínas mutantes de Ras son insensibles a GAP, permitiendo la unión y activación de proteínas constitutivas GTP, con una posterior activación persistente de efectores independiente de estímulos, en particular la cascada Ras–Raf–MEK–ERK ¹⁰⁶. En consecuencia cualquier mutación en los componentes que participan en la vía de señalización de ERK, ya sea el receptor tirosina quinasa, Ras GTPasa o B-Raf, producen desregulación de la vía de ERK que conduce a anomalías oncogénicas que derivan en señales de proliferación tumoral ¹⁰⁷.

La vía de ERK en la cascada de señalización de MAPK esta desregulada en un tercio de los cánceres en humanos. La implicación de ERK en el cáncer de próstata fue sugerida cuando se determinó que MKP-1 fosfatasa, la cual inactiva JNK y p38, estaba sobre-expresada en estadios iniciales del cáncer de próstata, y se asociaba a una disminución de JNK, pero no con la actividad del ERK ¹⁰⁸.

En estudios con ratones se ha demostrado la sobre-expresión ERK desde la hiperplasia prostática benigna hasta el carcinoma de próstata invasor. La expresión de ERK parece guardar relación con el grado de Gleason y el estadio tumoral ¹⁰⁹. Estudios sugieren una disminución de la expresión de ERK en tumores avanzados, mientras que otros relacionan la inactivación en carcinoma pobremente diferenciado y en tumores con fenotipo andrógeno independiente ^{92,110}.

También se ha relacionado la expresión de Raf-1 (C-Raf) y MEK1, junto a niveles elevados de ERK1/2 fosforilado, a la estimulación de la proliferación celular mediada por IL-6 a través de la vía de ERK. La expresión de IL-6 parece estar aumentada en cáncer de próstata comparada con el tejido normal, al igual que la proliferación celular ¹¹¹.

Se ha asociado la participación de ERK1/2 como promotor de la degradación de las proteínas de la matriz extracelular favoreciendo de esta manera la capacidad de invadir y parece tener un papel destacado en la remodelación del citoesqueleto, adhesiones focales y de filamentos de actina durante la migración celular. La fosforilación de proteínas como la calpanina proteasa, miosina, quinasa de adhesión focal y paxilina, todas ellas implicadas en el ensamblaje y des-ensamblaje de las adhesiones focales, permiten la migración de células tumorales favoreciendo de esta manera el desarrollo de metástasis ¹¹².

Los andrógenos intervienen en el funcionamiento normal de la próstata y parecen estar implicados en el desarrollo del cáncer. Niveles elevados de ERK han sido observados en tumores recurrentes después de la ablación androgénica, esto guarda relación con el papel de ERK1/2 como mediador de la activación de receptores de andrógenos y de la secreción de PSA a través del receptor tirosina quinasa, Her/neu en células de cáncer próstata andrógeno-independientes ¹¹³, lo que sugiere que un aumento en la señal de ERK pueda estar implicado en la progresión del cáncer de próstata y su evolución a independencia androgénica.

Estudios en líneas celulares de cáncer de próstata han demostrado que la activación constitutiva de la vía de señalización de ERK disminuye los requerimientos de andrógenos de las células tumorales LNCaP para crecer y reducir la expresión de PSA ¹¹⁴. En combinación con rapamicina, un inhibidor de mTOR (PD0325901), inhibe el

crecimiento celular en diferentes vías celulares del cáncer de próstata in vitro y en modelos en tejidos vivos de ratones con de cáncer de próstata. En especímenes humanos una activación paralela de la vía de señalización Akt/mTOR y ERK fue observada de manera similar ¹¹⁵.

La activación de ERK es necesaria para mantener la síntesis de DNA en las células tumorales LNCaP, DU145 y PC-3 y debe desempeñar un papel en la regulación de la inducción de la transcripción génica inducida de andrógenos ¹¹⁶.

1.3.3 Vías de transducción activadas por estrés celular-JNK y p38

La quinasa con extremo N-terminal Jun, también conocida JNK pertenece al grupo de proteínas quinasas activadas por estrés, implicadas en diversos procesos biológicos como el desarrollo celular, morfogénesis y diferenciación celular ¹¹⁷.

La vía de señalización de JNK es activada por estímulos de estrés, factores de crecimiento, rayos ultravioletas y citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-6 o IL-1, que permiten la activación de JNK a través de una serie de reacciones en cascada en las que participan inicialmente GTPasas tipo-Ras ⁴⁰, a través del módulo MAPKKK-MKK4/7-JNK ^{118,119}. Para su activación completa es necesaria una fosforilación dual simultánea de sus residuos de treonina y tirosina, y dependiendo del tipo específico de estímulo y de célula, cada isoforma concreta de JNK fosforilará diferentes sustratos, como pueden ser factores de transcripción (p53 o c-Myc) o también miembros de la familia de Bcl-2 ^{119,120}.

Se han determinado tres isoformas bien caracterizadas de JNK, JNK1, JNK2 y JNK3 (SAPK- γ , SAPK- α , SAPK- β respectivamente), cuyas funciones, también diferentes a nivel celular, parecen desempeñar papeles distintos en respuesta a estímulos extracelulares específicos, a la isoforma activada y del tipo celular del tejido donde se encuentren. La JNK1 y JNK2 están ampliamente distribuidas por todos los tejidos, en cambio la JNK3 solo se ha encontrado en testículos, corazón y cerebro ⁹².

La activación de JNK puede tener una actividad pro-apoptótica o anti-apoptótica, si bien, esto depende directamente de la duración del estímulo ¹²¹. Estímulos inferiores a 1 hora favorecen una actividad anti-apoptótica, mientras que periodos superiores a 1 hora favorecen una acción pro-apoptótica ¹²².

Dependiendo de la localización, citoplásmica o nuclear, JNK puede tener diferentes funciones. Por ejemplo la proteína JNK-interactiva (JIPs), una proteína de ensamblaje, determina una localización subcelular de JNK, que le permite además de sus actividades anti-apoptótica y pro-apoptótica a nivel nuclear, participar en la migración celular ¹²³. Por inhibición química JNK puede bloquear la fosforilación de la paxilina, disminuyendo la migración celular de distintos tipos celulares ¹²⁴.

Estudios en nódulos pulmonares de ratones carentes de JNK1 y JNK2 han demostrado un incremento significativo del crecimiento tumoral en ausencia de JNK, lo que define un papel supresor tumoral a JNK ¹²⁵. Si bien estudios han encontrado que JNK puede tener funciones opuestas dependiendo del estímulo celular y la isoforma ¹²⁶.

Se ha demostrado que alteraciones crónicas en la actividad de JNK están presentes en varios tipos de cáncer, como próstata, mama y páncreas ^{127,128}. Se ha demostrado la sobre-expresión nuclear y citoplásmica de JNK en células epiteliales malignas de carcinoma de próstata comparándolo con tejido normal y glándulas hiperplásicas. Esta sobre-expresión ha podido ser determinada en tumores órgano-confinados, si bien parece estar muy reducida o ausente en tumores localmente avanzados y en las metástasis de cáncer de próstata ^{127,128}.

Varios estudios han proporcionado información acerca del papel de JNK como promotor de la transformación celular. JNK es una proteína quinasa encargada de fosforilar c-Jun en el dominio de activación transcripcional Ser63 y Ser73 y la fosforilación de estos sitios se produce en respuesta a la expresión oncogénica ¹²⁹.

Las alteraciones de JNK en el cáncer de próstata también se relacionan a alteraciones en otras vías. En cáncer de próstata la vía de PI3K/Akt está activada de forma independiente ¹¹⁵, además de ser un regulador negativo de la vía de señalización de JNK-MAPK. También se han determinado que JNK es regulador positivo de la función de p53, en el contexto de una vía intrínseca de supresión tumoral estimulada por oncogenes ¹¹⁷.

Kwon et al, han descrito que tras la inhibición química de JNK las células con cáncer de próstata DU145 reducen la migración celular y la expresión del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), factores pro-angiogénicos que quizás facilitarían el crecimiento tumoral y la metástasis ⁹². Por lo que a pesar de su papel anti-apoptótico, JNK podría estar relacionada con el desarrollo de metástasis en cáncer de próstata, ya que tiene la capacidad de regular la adhesión celular, migración e invasión ¹³⁰.

La activación de JNK también depende de los receptores de andrógenos. Esto hace referencia a la terapia de ablación androgénica, una terapia ampliamente utilizada en cáncer de próstata avanzado, en la que probablemente se induzca apoptosis por activación de la vía de JNK ¹³¹. Se requiere una activación transcripcional de los receptores de andrógenos para disminuir la activación de JNK mediante andrógenos. Un aumento de los andrógenos produce una disminución de la fosforilación de JNK y en consecuencia de la apoptosis. En cambio se ha visto que JNK tiene la capacidad de fosforilar los receptores de andrógenos en células de cáncer de próstata, inhibiendo las respuestas dependientes del receptor de andrógenos ¹³². Otro estudio ha determinado que el aumento c-Fos y c-Jun, dianas directas de JNK, están aumentados en tumores avanzados andrógeno independiente y se asocian a activación del ERK, sin embargo en esta situación la activación de JNK esta disminuida, lo que indica que c-Jun podría estar regulado por otra vía ¹¹⁵.

p38 MAPK es una quinasa activada por estrés, que participa primordialmente en la diferenciación celular, crecimiento, proliferación, supervivencia y apoptosis ¹³³.

La activación de esta quinasa se produce por estímulos procedentes de rayos ultravioletas, choque térmico, citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1) y factores de crecimiento (EGF, TGF- β) ¹³⁴.

La activación de la vía de p38 se produce a través del módulo MAPKKK-MKK3/4/6-p38 MAPK ¹³⁵.

Se han caracterizado cuatro isoformas ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$), si bien la más estudiada, y más expresadas en los tejidos son p38 α MAPK y p38 β MAPK, la primera es imprescindible e insustituible en las funciones celulares. La expresión de otras isoformas γ y δ , están restringidas a tejidos como páncreas, testículo, músculo, pulmón, riñón y glándulas endocrinas¹³⁶.

Se ha podido corroborar que la activación de p38 induce proliferación y movilidad celular en ausencia de mutación de Ras¹³⁷. Esta quinasa actúa de forma general como un supresor de la señalización de Ras y ERK1/2^{135,138}. Se ha descrito que la activación de p38 en presencia de mutaciones inactivantes de Ras disminuía los niveles de ERK fosforilado, demostrando de esta manera que existía un sistema de compensación entre ambas MAPK. Así mismo se ha podido demostrar que, este efecto inhibitorio de p38 ocurre simultáneamente a una activación de JNK¹³⁹. Este entrecruzamiento entre las diferentes vías y los diferentes mecanismos auto-regulatorios permiten que la familia de MAPK pueda regular su propia vía de señalización.

p38 interviene en los mecanismos de apoptosis de forma contradictoria. Puede tener una función pro-apoptótica o anti-apoptótica, dependiendo del estímulo, el sistema celular y la isoforma involucrada¹⁴⁰. Se han encontrado células neoplásicas de cáncer de próstata de modelos in vitro, en las que p38 tiene un papel pro-apoptótico^{141,142}, sin embargo en tejidos vivos normales y embrionarios se ha visto que la activación de p38 puede inducir proliferación celular y bloquear la apoptosis¹⁴³. Este comportamiento dual de p38 podría explicarse por su capacidad de regular la biosíntesis de las moléculas implicadas en la respuesta inflamatoria inicial relacionadas con las fases iniciales del desarrollo del tumor¹⁴⁴.

Alteraciones en la vía de p38 se le ha asociado a múltiples tumores sólidos, como cáncer de páncreas, gástrico, mama, pulmón y próstata¹⁴⁵ y también a algunas neoplasias hematológicas^{119,120}.

Una de las funciones de p38 α MAPK es aumentar o disminuir la estabilidad del m-RNA, regulando la capacidad de unión del m-RNA que codifican proteínas involucradas en la diferenciación de mioblastos en miotúbulos¹⁴⁷. Mediante la unión a HSP27 en su forma no-fosforilada, puede unirse a la actina capándola, de esta forma bloquea la polimerización¹⁴⁴. Si bien su participación en la migración celular aún está por determinarse, esto podría aportar datos acerca de su papel en el desarrollo de metástasis.

En contraste con lo dicho anteriormente, p38 también puede ejercer un efecto protector en la apoptosis mediado por TNF en células de cáncer de próstata (LNCaP)¹⁴⁵. Y también se le ha relacionado con la senescencia como una forma de evadir la transformación oncogénica.

p38 está presente en las células epiteliales y basales normales de la próstata. Se ha podido demostrar que p38 está sobre-expresada en las glándulas hiperplásicas y esta expresión aumenta progresivamente en el epitelio neoplásico de la neoplasia intraepitelial prostática (PIN), el cáncer de próstata bien y moderadamente diferenciados, si bien, en adenocarcinomas avanzados y metástasis su expresión esta disminuida significativamente o incluso ausente^{92,127}.

A pesar de que p38 tiene un importante papel pro-apoptótico, quizás contribuya a la progresión del cáncer de próstata promoviendo el crecimiento tumoral, la adquisición de independencia androgénica y desarrollo de metástasis ⁹². Otras cualidades atribuibles a p38 son el aumento de la supervivencia de las células tumorales, clonogenicidad e invasividad en líneas celulares de cáncer de próstata, proporcionando de este modo un soporte adicional en la adquisición de un fenotipo con independencia androgénica ¹⁴⁸.

Se ha propuesto el papel de IL-6 en el aumento de la expresión y actividad de receptores de andrógenos (AR), promoviendo de esta forma el crecimiento tumoral independiente de andrógenos. Esto es debido a que se ha demostrado que la respuesta androgénica inducida por IL-6 depende de la actividad de p38 ¹⁴⁹.

JNK y p38 tienen un papel importante en la mediación de apoptosis inducida por estrés y la inducida por agentes quimioterápicos, por lo que son importantes determinantes en la respuesta celular a las terapias convencionales. Para la activación de p38 como agente apoptótico son necesarias la inactivación de p53 y mutaciones de Ras. ¹⁵⁰

Por ultimo mencionar que diversos trabajos han demostrado que la familia de las MAPK, son el grupo de enzimas más importantes que existe en mamíferos. La actividad de los diferentes inductores de la vía y los mecanismos reguladores inhibitorios de las diferentes cascadas de señalización celular, así como el equilibrio entre las diferentes MAPK, en especial las MAPK inducidas por estrés p38 y JNK, son determinantes en las respuestas biológicas y son un reflejo del elevado nivel de sofisticación y complejidad de este sistema.

1.3.4 Regulación de la actividad de las vías de transducción de señal de las MAPK: fosfatasas específicas duales (dual-specificity MAPK phosphatases, MKP)

Se han descrito hasta el momento al menos 11 enzimas activas que forman parte de la familia de las fosfatasas específicas duales (MKP). Estas fosfatasas son las encargadas de inactivar o desfosforilar las diferentes MAPK. La afinidad por estas MAPK depende de la localización subcelular de la enzima MKP, que puede ser citoplásmica o nuclear, sino también de la variable afinidad molecular por las diferentes MAPK, pudiendo inactivar específicamente una o más MAPK.

Todas las MKP tienen una estructura en común, que incluye un dominio catalítico C-terminal y un extremo N-terminal no activo. En el extremo N-terminal encontramos un grupo de residuos de aminoácidos básicos serina/treonina, que participan en el reconocimiento del sustrato y unión a MAPK a través la denominada secuencia de interacción con quinasas (KIM, kinasa interaction motif). Este KIM determina la localización subcelular de cada una de las MKP y es el que determina específicamente a cuál de las MAPK se va a unir ^{41,151,152}. Por ejemplo una mutación precisa de KIM impide la unión de ERK y p38 a MKP-1, pero no tiene efecto sobre JNK. Esto es debido a que las formas activadas de ERK y p38 se unen a MKP-1 en el mismo sitio, pero no JNK. En general las fosfatasas también se diferencian en si están en conformación activada en el momento de unirse al ligando o, si es la unión al ligando

quien media un cambio en la conformación de la fosfatasa, que inhabilita la formación de sitio catalítico activo ^{153,154}.

Las MKP se subdividen en base a la similitud de sus secuencias, su estructura génica, localización subcelular y especificidad por los sustratos, en tres distintos grupos (Figura 6).

- El primer grupo comprenden cuatro fosfatasa quinasas nuclear inducibles, DUSP1/MKP-1, DUSP2/PAC-1, DUSP4/MKP-2 y DUSP5/hVH-3, con gran especificidad para inactivar JNK, p38 y ERK, excepto DUSP5 que parece actuar de forma selectiva sobre ERK1/2.
-
- El segundo grupo lo constituyen tres proteínas MKP citoplásmicas, con una elevada afinidad por ERK, DUSP6/MKP-3, DUSP7/MKP-X y DUSP9/MKP-4. De ellas MKP-3 es la que mayor afinidad tiene ERK, y ninguna sobre JNK y p38.
-
- El tercer grupo está compuesto por tres MKP, que tienen una localización citoplásmica y nuclear, DUSP8/hVH-5, DUSP10/MKP-5 y DUSP16/MKP-7, que inactivan selectivamente MAPK activadas por estrés, p38 y JNK y no tienen actividad sobre ERK ^{96,155-157}.

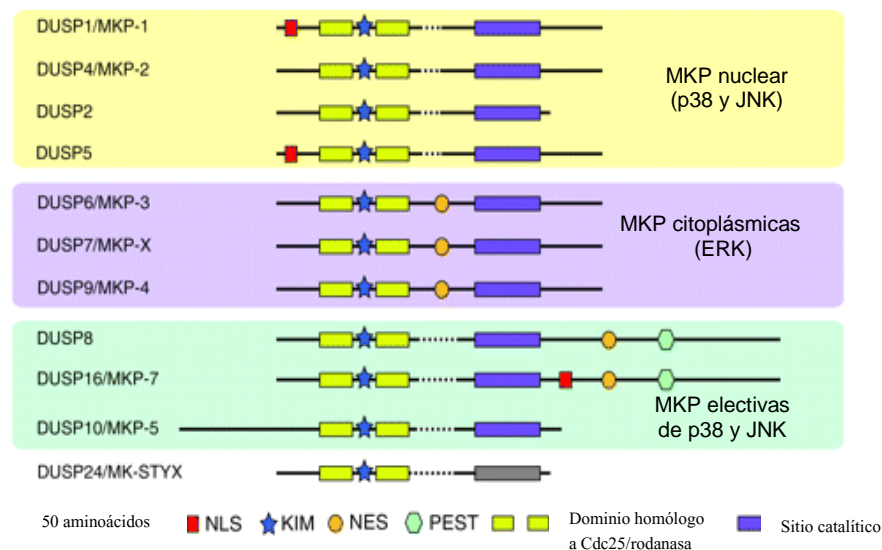


Figura 6. Grupo filogénicos y dominios estructurales de las MKPs. NLS: señal de localización nuclear; KIM: motivo conservado de la interacción con quinasas; PEST: secuencias ricas en prolina, glutamato/aspartato, serina y treonina. Adaptado de "Dickinson RJ & Keyse SM, 2006, J Cell

Existe otro grupo de DUSP atípicas, son 19 fosfatasas aun no bien estudiadas que tienen como sustrato MAPK, pero también otras dianas en la célula que aún se desconocen^{70,96,158}.

Las MKP se activan de forma inmediata tras su expresión, pero además otros mecanismos regulan esta activación, estos son la inducción de la transcripción, cambios en la estabilidad de la proteína por fosforilación y la activación catalítica¹⁵⁹. Para esto se requiere primeramente, una modificación mediante fosforilación en los residuos de tirosina y treonina para que las MAPK sean activadas.

Las MKP desempeñan un papel fundamental en la función inmune, respuesta a estímulos por estrés y la homeostasia metabólica¹⁶⁰. La primera MKP identificada en células de mamíferos fue DUSP8, que específicamente está relacionada con las MAPK, JNK y p38 activadas por estrés¹⁶¹. Posteriormente se fueron caracterizando otras MKP, como DUSP10/MKP-5 y DUSP16/MKP-7. De estas solo DUSP10/MKP-5 ha sido estudiada en mamíferos. Originalmente esta se identificó como capaz de regular JNK y p38 MAPK, pero no ERK¹⁶². Se ha descubierto que DUSP10/MKP-5 m-RNA es inducida en líneas celulares de macrófagos de ratones por bacterias lipopolisacáridas (LPS) y parece desempeñar un papel como regulador negativo de la vía de señalización de JNK, por lo que parece estar relacionada con la respuesta inmune innata y es un regulador del adecuado funcionamiento de células T.

DUSP2/PAC-1 es la MKP más asociada a las células del sistema. Estudios en modelos experimentales de ratones carentes de DUSP2/PAC-1, se produce una disminución de la expresión de mediadores pro-inflamatorios y citoquinas, por lo que estos ratones son resistentes a la artritis inmune^{96,163,164}. DUSP2/PAC-1 parece ser un regulador negativo in vitro de ERK y p38 MAPKs, esto se ha visto en macrófagos tratados con bacterias lipopolisacáridas (LPS) que muestran niveles aumentados de JNK, y la inhibición farmacológica de la actividad de JNK en estos macrófagos produce un incremento en la actividad de ERK¹⁶⁴.

MKP-1 es una fosfatasa nuclear específica que desfosforila proteínas de la familia MAPK. Originalmente se pensaba DUSP1/MKP-1 tenía como diana solo ERK, sin embargo ahora se sabe que también tienen un papel clave en la regulación fisiológica de señalización de las vías ERK, JNK y p38 MAPK, es más el orden de afinidad de MKP-1 por sus sustratos MAPK es el siguiente: p38>JNK>ERK, y dentro de ERK, ERK2>ERK1^{40,165}. A diferencia del tipo de interacción que ocurre entre MKP-1 y p38 o JNK, MKP-1 parece no desfosforilar directamente a ERK, sino que compete con los efectores de ERK evitando su unión y fosforilación¹⁶⁶, quizás esta sea la razón por la que MKP-1 tiene menor afinidad por ERK.

La vida media de MKP-1 es de 1-2 horas, la cual varía dependiendo del estímulo. Los estímulos que activan MKP-1 pueden ser múltiples y los mismos que activan las MAPK, como son las situaciones de estrés celular.

MKP-1 se expresa en condiciones normales en tejidos como músculo, cerebro, hígado y tejido adiposo de adultos. Y parece desempeñar un papel importante en el adecuado desarrollo de los órganos fetales¹⁶⁶, además de participar en la homeostasis metabólica.

También se le ha relacionado con aumento de apoptosis por incremento de la actividad de JNK y p38. Esto se ha demostrado a partir de estudios en fibroblastos embrionarios de ratones (MEF) deficientes de MKP-1, los que además presentaban bajas tasas de crecimiento por incremento de la actividad apoptótica¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Esto parece demostrar que MKP-1 promueve la supervivencia celular mediante la atenuación de la señal a través de la vía de las MAPK activadas por estrés.

La ausencia de MKP-1 produce una activación prolongada de p38 en macrófagos tratados con LPS, por lo que podría estar implicada en la respuesta inmune innata. Además esta carencia de MKP-1, también promueve la sobreproducción de citoquinas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias (IL6, IL10 y TNF), favoreciendo el desarrollo enfermedades reumatológicas y artritis autoinmune en ratones¹⁶⁷ y también se le ha relacionado con resistencia a la obesidad inducida a una dieta rica en grasa e intolerancia a la glucosa¹⁶⁹.

MKP-1 actúa como un mecanismo de control que atenúa la actividad de la señal celular mediada por las MAPK¹⁷⁰, esto se debe a que las MAPK pueden aumentar la actividad catalítica de MKP-1 al unirse a ella, y la fosforilación de ERK inhibe la degradación de la proteína MKP-1 mediante la fosforilación de residuos de Ser359 y Ser354¹⁷¹. Por otro lado ERK1/2 puede degradar MKP-1 mediante la fosforilación de los residuos Ser296 y Ser323¹⁷².

Existen una multitud de factores y condiciones que regulan MKP-1. El choque térmico y daño hipoxia/isquemia por reperusión, generan especies reactivas de oxígeno y proteínas mal plegadas que afectan al retículo endoplásmico, mitocondria, el citoplasma y el núcleo generando a su vez, más especies reactivas de oxígeno, que afectan el compartimento nuclear mediante cambios transcripcionales con daño del DNA^{173,174}. El choque térmico aumenta la actividad de p38 MAPK y la inhibición de esta MAPK reduce el incremento de los niveles de MKP-1. La hipoxia por lo contrario aumenta la expresión MKP-1 inestable, por lo que este mecanismo parece proteger a las células de la apoptosis¹¹⁸.

Otro mecanismo que limita la actividad de la proteína MKP-1 recae dentro de la región C-terminal de MKP-1, que auto-inhibe la actividad fosfatasa. En MKP-1 el extremo C-terminal truncado tiene una actividad fosfatasa más alta, sin modificar su especificidad del sustrato¹⁷⁵. Sabiendo que la unión de MKP-1 a uno de sus sustratos MAPK (ERK1/2, JNK o p38), aumentara su actividad fosfatasa, desfosforilando una o más MAPK, a las que este unida¹⁷⁶. El conocer el fragmento donde éste extremo C-terminal se une por su cuenta a otras proteínas, podría revelarnos otro punto de control de esta fosfatasa.

Los primeros estudios acerca de la regulación y función de MKP-3 se realizaron en estudios en embriones de ratones¹⁷⁷, encontrándose esta fosfatasa en los arcos branquiales y cerebro medio de ratones, lo que sugiere su relación con el inicio del desarrollo embrionario. Estudios con factores de crecimiento fibroblástico (FGF) en embriones de pollo, se ha visto que éstos son esenciales para la producción de MKP-3¹⁷⁸ y podrían regular la expresión de MKP-3. MKP-3 a su vez, parece ser un regulador negativo crucial de la señal de estos factores de crecimiento fibroblástico en tejidos¹⁷⁹.

De todas las MKP citoplásmicas, DUSP6/MKP-3 es la mejor caracterizada y actúa específicamente sobre ERK. MKP-3 es un sustrato de ERK *in vitro*¹⁸⁰, y también puede ser fosforilada bajo estímulos específicos por otra vía también implicada en el crecimiento y proliferación celular como la vía de mTOR (mammalian target of rapamicina). Cuando se produce la desfosforilación vía mTOR la vida media de MKP-3 se reduce, lo que sugiere que ambas vías podrían estar interconectadas y colaborar¹⁸¹. También se ha identificado otra vía por la que MKP-3 puede ser fosforilada, a través de la proteína quinasa CK2α/caseína quinasa 2, otra quinasa ubicua involucrada en la regulación de la proliferación celular y supervivencia¹⁸².

MKP-3 es degradada mediante fosforilación¹⁸¹, puede ser inducida por varios factores de crecimiento y es MEK independiente. La activación catalítica de MKP-3 parece depender de su interacción con ERK, principalmente a través del dominio KIM en el extremo NH2 de la fosfatasa y el dominio terminal COOH¹⁵⁷.

Las consecuencias de las interacciones entre los distintos miembros de la familia MAPK cada vez son más reconocidas, y los estudios nos están permitiendo avanzar en la comprensión de cómo, dónde y porque ocurren estas interacciones entre los distintos ejes e isoformas en la familia de las MAPK. Además el comprender su funcionamiento estamos aprendiendo la forma en la que esta vía MAPK interactúa con otros módulos de señalización distintos a MAPK, permitiéndonos crear mapas de conexión entre los diferentes vías^{39,183,184}.

Las señales de transducción entre los ejes de MAPK (Raf-MEK1/2-ERK, MEKKK-MKK4/7-JNK y MEKKK-MKK3/4/6-p38) no ocurren siempre de forma lineal, existen múltiples interacciones estimuladoras e inhibitorias dentro y a través de este módulo⁴⁰ (Figura 7). Como comentamos anteriormente los distintos miembros de la familia de MAPK pueden modular sus propias señales de transducción. Este cruce puede ocurrir a cualquier nivel y también poseen mecanismo de regulación negativo en el m-RNA y a nivel proteico^{107,135}.

Un equilibrio regulatorio según el tipo de estímulo ya sea inhibitorio o de activación entre las distintas MAPK es necesario para su adecuado funcionamiento. Por ejemplo: si p38 y JNK son activados, estos inducen la muerte celular por apoptosis, de forma secundaria elevan la actividad de ERK1/2 relacionado fundamentalmente con la proliferación celular. A su vez niveles elevados de la forma fosforilada de ERK1/2 estimulan la expresión de MKP-1 como mecanismo regulatorio de la actividad de la vía, induciendo la desfosforilación de JNK y p38, y en consecuencia reduciendo la apoptosis.

Como podemos ver las funciones de MKP son complejas y tienen la capacidad de modular diferencialmente múltiples vías de MAPK, que den lugar a respuestas biológicas completamente distintas y contradictorias.

Debido al cruce de las vías de señalización, la pérdida de cualquiera de los genes de una fosfatasa da lugar al aumento de la regulación de otros miembros de la familia o la sobre-expresión de alguna de las MAPKs, por la inactivación de alguna de las isoformas de MAPKs.

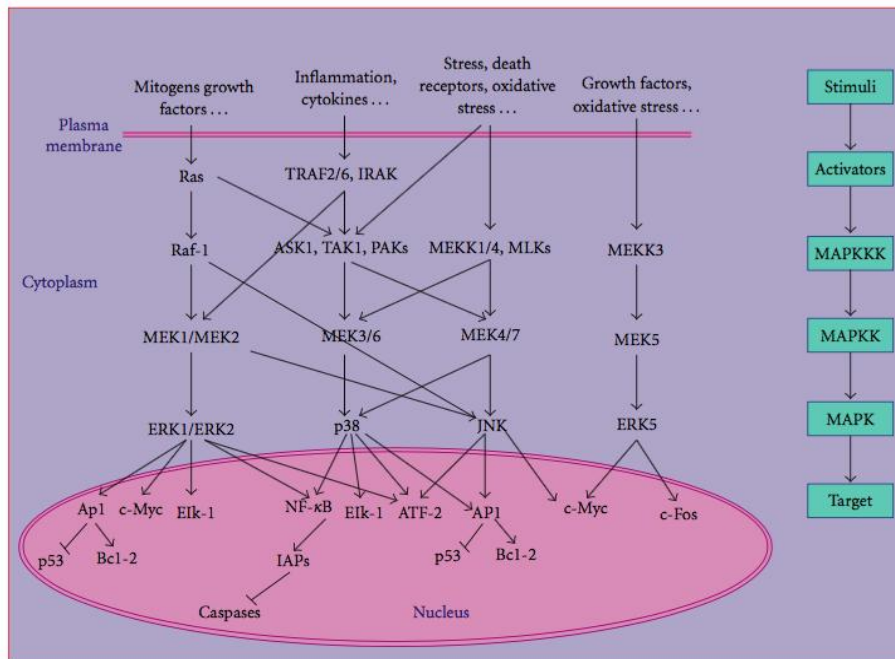


Figura 7. Vía de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos. Adaptado de Rodríguez-Berriguete G .Journal of Signal Transduction 2012 ²¹⁴

1.3.5 El papel de MKP-1 y MKP-3 en el cáncer

Como hemos comentado anteriormente MKP-1 desempeña un papel en la proliferación celular, diferenciación, respuestas al estrés, inflamación, arresto del ciclo celular y apoptosis, mayormente a través de la regulación de la señalización de las MAPK.

El papel que desempeña en la carcinogénesis guarda relación con su función fisiológica. La sobre-expresión de MKP-1 inactiva p38 y JNK, pero tiene poca actividad sobre ERK. Esto produce un desequilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular inducida por apoptosis, con disminución de las señales pro-apoptóticas y aumento de las señales anti-apoptóticas, lo que caracteriza a la carcinogénesis¹⁸⁵.

Anomalías oncogénicas han sido encontradas en los componentes reguladores de la vía de MEK/ERK y p38, y JNK podría tener un papel como supresor tumoral en determinadas condiciones¹⁷⁰. MAPKs además están implicadas en la respuesta tumoral a la quimioterapia y las MKP podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer.

Como hemos mencionado anteriormente, la hipoxia es un activador de MKP-1, y ésta es la base del desarrollo de muchos tumores. Estudios iniciales han demostrado un aumento de la expresión de MKP-1 en un número de neoplasias epiteliales en humanos como páncreas, próstata, colon y vejiga, sin embargo su expresión parece disminuir progresivamente al aumentar el grado de agresividad y la progresión de la enfermedad^{108,186,187}.

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios a veces son contradictorios. Tsujita detectó niveles ligeramente más bajos de MKP-1 en hepatocarcinomas (HCC) comparado con hepatocitos normales. El estudio lo realizó en dos modelos de ratas Fisher 344 (F344) y Brown Norway (BN). A diferencia de los resultados obtenidos en el estudio de otros tumores, Tsujita determinó una relación entre niveles bajos de MKP-1 la capacidad de desarrollar HCC en las ratas F344 y niveles altos de MKP-1 con resistencia a desarrollo de HCC en las ratas BN¹⁸⁸. El grupo de St. John también observaron estos mismos resultados, al estudiar carcinomas epidermoides (SCC) de cabeza y cuello, y demostraron que MKP-1 inhibía el desarrollo de carcinoma epidermoide al disminuir la IL-1 β del microambiente tumoral pro-inflamatorio¹⁸⁹.

En contraste con lo anteriormente descrito, el grupo investigador de Wang encontró niveles elevados de MKP-1 en células tumorales de cáncer de ovario tratadas con cisplatino. Esto sugiere que MKP-1 podría estar relacionado con la respuesta a la terapia con cisplatino, ya que estudios en ratones deficientes de MKP-1 en tratamiento con cisplatino, mostraban una eficiente activación de JNK y p38, con una consecuente buena respuesta al tratamiento¹⁹⁰. Estos mismos hallazgos fueron demostrados en otros estudios realizados en carcinomas no microcíticos de pulmón (NSCLC)¹⁹¹ y carcinomas pobremente diferenciados de mama¹⁹² por lo que podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de la quimioresistencia en algunos tumores.

Si bien la gran mayoría de los estudios relacionan a MKP-1 con la progresión tumoral de manera uniforme en muchos de los tipos de tumor estudiados (próstata,

colon, vejiga y ovario), con pérdida progresiva de la expresión que se correlaciona con un alto grado histológico ¹⁰⁸.

La manera en la que MKP-1 promueve la carcinogénesis es a través de la inhibición de la fosforilación de JNK, en cambio su participación como inhibidor de la progresión, es mediante la inhibición de la fosforilación de ERK. En estadios avanzados, la disminución de la expresión de MKP-1 favorece la proliferación y aumento de tamaño de la masa tumoral, esto mediante un aumentado de la señalización de la vía de ERK ¹⁹³.

Respecto al papel que desempeña MKP-3, mencionar que el gen de esta fosfatasa se localiza en la región 12q21-q231. Un aumento de la expresión favorece la apoptosis, por lo que tiene influencia sobre crecimiento tumoral.

Los primeros estudios demostraron que la expresión de MKP-3 estaba disminuida en tumores la neoplasia intraepitelial de páncreas, con una subsecuente disminución de la expresión en el carcinoma ductal infiltrante de páncreas. Los mecanismos por los que se produce esta disminución de la expresión en el cáncer páncreas fueron investigados por Xu y colaboradores, en los que encontraron una hipermetilación del gen promotor ¹⁹⁴. El grupo de Okudela estudiaron tumores de pulmón, observaron niveles muy reducidos de MKP-3 en tumores de alto grado, determinando un valor predictivo independiente del periodo libre de enfermedad y la supervivencia global en relación a esta fosfatasa ¹⁹⁵.

Otras publicaciones también describen esta misma tendencia de pérdida de expresión de MKP-3 en cáncer de ovario y mama, y al igual que MKP-1 lo asocian a quimioresistencia a cisplatino y tamoxifeno respectivamente. En su estudio Chan y colaboradores, demuestra que la sobre-expresión de MKP-3 en células de cáncer de ovario restablece la inhibición de ERK aumentando de esta manera la sensibilidad a cisplatino ¹⁹⁶.

Además otro estudio ha demostrado que la pérdida de expresión de MKP-3 está asociada a mutaciones de K-Ras, que a su vez aumenta la activación de ERK1/2 favoreciendo un fenotipo maligno e invasor ¹⁹⁷.

A medida que crece nuestro conocimiento acerca de la base bioquímica y estructural de estas enzimas MAPK, así como la comprensión de su catálisis y especificidad del sustrato, estamos avanzando en la comprensión del papel que desempeñan estas enzimas en los procesos fisiológicos de las células y tejidos de los mamíferos, que ante agresiones y estímulos oncogénicos favorecen la carcinogénesis.

Estas MAPK están ampliamente distribuidas en todos los tejidos de mamíferos y debido al papel fundamental que desempeñan en los procesos celulares, la presencia de alteraciones en cualquiera de las vías de señalización en las que intervienen, han sido relacionadas con un amplio grupo de neoplasias malignas, y por lo tanto deberían estar involucradas de forma directa o indirecta en la génesis del cáncer ⁹⁶. La señalización anormal de las MAPK parece tener consecuencias importantes en el desarrollo y progresión del cáncer en humanos, y también juega un papel determinante en la respuesta tumoral a terapias convencionales contra el cáncer.

En estudios iniciales ERK y MKP-1 estaban expresados y fueron detectados en la región dorsolateral de la próstata de ratones, esto dependía de la estimulación androgénica. ERK y MKP-1, estaba altamente expresado en las lesiones displásicas, pero MKP-1 m-RNA y sus proteínas disminuían rápidamente en respuesta a la combinación de estradiol 17 β y testosterona. Estudios posteriores han corroborado la sobreexpresión de MKP-1 en la neoplasia intraepitelial prostática, y a medida que el daño celular acumulativo y mutaciones en el DNA aumentan con la adquisición de un fenotipo invasor, la expresión tiende a disminuir, hasta desaparecer en tumores de alto grado histológico y metástasis ¹¹⁰.

A diferencia de MKP-1 y otras MKPs, es la pérdida absoluta de expresión de MKP-3 la que parece estar relacionada con la progresión tumoral.

Los andrógenos intervienen en el funcionamiento normal de la próstata y en la carcinogénesis. La terapia anti-androgénica, utilizada en cáncer de próstata, quizás induzca apoptosis por activación de la vía de JNK ¹³¹. Los pacientes tratados con esta terapia muestran disminución de la expresión de MKP-1 y de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, mientras que JNK está sobre-expresada. Por el contrario el tratamiento con andrógenos aumenta la expresión de MKP-1 ¹⁹⁸.

Estas fosfatasa desempeñan un papel crucial en la progresión de la enfermedad y el desarrollo de quimioresistencia, lo que supone una vía interesante de estudio para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas en este grupo de pacientes.

Debido a que las MAPK y MKP, puede desempeñar un papel promotor o supresor tumoral, con respuestas a veces contradictorias, la interpretación de la expresión de sus distintas formas fosforiladas dependen contexto, según el tipo de tumor, por lo deben ser interpretadas y analizadas con cautela.

En base a lo anteriormente descrito, en el presente estudio expondremos nuestra hipótesis y objetivos, la procedencia y manejo del material, así como metodología que desarrollamos para recabar toda la información y llegar a los resultados tras analizar la expresión inmunohistoquímica de las formas fosforiladas de las MAPKs, ERK, p38 y JNK y las MKPs, MKP-1 y MKP-3, y su relación con las distintas variables analizadas en muestras de cáncer de próstata.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

La familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en condiciones fisiológicas desempeñan un papel fundamental en las funciones celulares, controlando procesos como la proliferación, diferenciación desarrollo, respuestas a estímulos por estrés, adhesividad, migración y muerte celular.

Alteraciones en las vías de estas enzimas han sido implicadas en una variedad de neoplasias malignas y recientemente se han asociado alteraciones de estas proteínas con el desarrollo del cáncer de próstata.

El papel que desempeña en la carcinogénesis guarda relación con su función fisiológica. MKP-1 inactiva las formas fosforiladas de p38 y JNK, promoviendo de esta manera la carcinogénesis e inhibe la progresión tumoral mediante desfosforilación de ERK.

La expresión de MKP-1 parece disminuir progresivamente en cáncer de próstata al aumentar el grado histológico, y se ha descrito la asociación entre la disminución de la expresión y la progresión a un estado de independencia androgénica, por bloqueo de la apoptosis mediada principalmente por JNK.

MKP-3 tiene como diana ERK, cuya función principal es la proliferación celular. La pérdida de expresión de MKP-3 se ha asociado a progresión de la enfermedad a un estado de independencia androgénica.

Por lo tanto MKP-1 y MKP-3 pueden ser factores pronósticos en cáncer de próstata que según el patrón de expresión, nos permitan categorizar grupos con mayor riesgo de recidiva y progresión de la enfermedad. Además de ser posibles predictores de la respuesta a la quimioterapia, podrían constituir una atractiva diana terapéutica.

OBJETIVOS

1.- Estudiar el patrón de expresión inmunohistoquímica de MKP-1 y MKP-3, y las formas fosforiladas (activas) de sus sustratos MAPK (ERK, p38 y JNK) en el tejido parafinado de una cohorte de pacientes con cáncer de próstata.

2.- Establecer una relación entre los hallazgos en la expresión de cada uno de los marcadores MKP y sus dianas fosforiladas MAPK, para establecer una probable vía de interacción.

3.- Analizar según el patrón de expresión de MKP-1 y MKP-3 y las formas fosforiladas de ERK, p38 y JNK, su relación con las distintas variables, clínicas, bioquímicas y morfológicas.

4.- Determinar el valor pronóstico de MKP-1 y MKP-3 y las formas fosforiladas de ERK, p38 y JNK, como factor pronóstico en la cohorte estudiada de cáncer de próstata.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Selección de casos, datos clínicos, variables bioquímicas y selección de material histológico para construcción de matrices de tejidos.

3.1.1 Selección de casos

3.1.1.1 Criterios de inclusión

Se seleccionaron pacientes varones con adenocarcinoma de próstata, que fueron tratados mediante prostatectomía radical retropúbica y linfadenectomía bilateral, entre los años 1995 y 1997 en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, España), con un total de casos de 95 pacientes.

Sólo se incluyeron en el estudio los pacientes que fueron seguidos durante un periodo de 13 años, con determinaciones bioquímicas periódicas de PSA cada 6 meses durante el primer año y anualmente en los años siguientes. El punto de corte en el seguimiento se hizo en diciembre de 2010. Al tratarse de un estudio retrospectivo realizado anterior al real decreto del año 2011 y previamente consultado al comité de ética del hospital en el año 2006 cuando se inició el estudio, no se solicitó consentimiento informado a los pacientes.

3.1.1.2 Criterios de exclusión

Fueron excluidos del estudio 7 casos en los que resultó imposible revisar las historias clínicas y/o la evolución postquirúrgica.

3.1.2 Datos clínicos y variables bioquímicas del estudio

Los datos clínicos se obtuvieron de forma retrospectiva revisando las historias clínicas del archivo del hospital, que tuvieran un seguimiento de 13 años.

Se recogieron los siguientes parámetros:

- *Numero de historia clínica*
- *Fecha de nacimiento y edad al momento del diagnóstico*
- *Fecha de la cirugía de prostatectomía*
- *Estadio clínico según la TNM al momento del diagnóstico*
- *Cuantificación del PSA al momento del diagnóstico*
- *Volumen prostático medido por estimación ecográfica*
- *Tratamiento hormonal o radioterápico previo a la cirugía*
- *Presencia de metástasis al momento del diagnóstico*
- *Valores de PSA postoperatorio*
- *Tiempo de recidiva bioquímica*
- *Bloqueo hormonal o radioterapia postquirúrgico*
- *Desarrollo de enfermedad a distancia*
- *Muerte por enfermedad u otra causa*
- *Desarrollo de otras neoplasias*

Las variables independientes analizadas fueron la edad, el PSA en sangre preoperatorio y el PSA en sangre postquirúrgico cada 6 meses durante el primer año y posterior anualmente.

El tiempo hasta la recidiva bioquímica medido en meses desde el momento del diagnóstico, en aquellos casos en los que hubiera una elevación del PSA posterior a la cirugía. La recidiva bioquímica se definió como un valor de PSA superior a 0,2 ng/ml en una determinación en sangre posterior a la cirugía.

Solo 3 pacientes recibieron bloqueo hormonal (BH) y 2 pacientes recibieron radioterapia (RT) previo a la prostatectomía radical (PR).

De nuestra serie 20 pacientes desarrollaron resistencia, tras haber sido tratados con ablación androgénica por recidiva bioquímica de la enfermedad, 11 pacientes desarrollaron metástasis posterior a la cirugía, tratamiento hormonal o radioterapia.

3.1.3 Variables histológicas

Todo el material analizado procede de bloques de parafina del archivo del servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Las próstatas fueron previamente pesadas y medidas, fijadas en formol al 10% y pintadas con tinta china, con la finalidad de determinar el estado de los márgenes de resección, un factor pronóstico importante y directamente relacionado con la probabilidad de recidiva tumoral en el lecho quirúrgico. Las próstatas fueron incluidas en su totalidad en parafina.

En el estudio histológico del tumor en su totalidad, se determinó el grado de diferenciación, según los criterios descritos por Donald Gleason y actualmente utilizados ampliamente en todo el mundo hace más de 35 años.

Estos patrones básicos se basan en el estudio de las glándulas neoplásicas que varían según sus características morfológicas y arquitecturales en un rango de 1 a 5.

Un patrón 1 y 2 son patrones bien diferenciados, prácticamente semejantes a glándulas normales de la próstata, que con frecuencia son nodulares y bien definidos en piezas de prostatectomía y difíciles de reconocer en biopsias de cilindros, con la importante diferencia de que carecen de estrato de células basales, característica de las glándulas neoplásicas, por lo que con frecuencia en la biopsias estos pequeños focos tumorales son diagnosticados como focos de proliferación microacinar atípica.

Un patrón 3 corresponde a un tumor de bordes más imprecisos compuestos por glándulas tumorales cuyo tamaño puede ser variable, desde pequeño a medio, incluso grande, pero usualmente separadas entre sí por estroma.

El patrón 4 y 5 son patrones más complejos que implican un peor grado de diferenciación y consecuentemente un peor pronóstico. En el patrón 4 el tumor suele ser permeativo, con bordes imprecisos y las glándulas muestran patrones complejos con fusión glandular, cribiforme, microacinar, micropapilar e hipernefroide. En el patrón 5 el crecimiento suele ser aún más difuso, sólido, dispuesto en sábanas y podemos encontrar células en anillo de sello y podemos encontrar comedonecrosis.

También hemos observado algunos de los patrones inusuales observados en algunos de los casos de nuestra serie. Tres casos con diferenciación de mucosecretora y 2 casos

de adenocarcinoma atrófico. Además de un caso con diferenciación mucosecretora, otro con extenso patrón hipernefroide y otro de patrón cribiforme, los cuales hemos considerado según los criterios morfológicos de Gleason, como patrón 4.

Siguiendo las recomendaciones actuales según la sistema de reporte para la gradación del cáncer de próstata según Gleason, valoramos la presencia de los diferentes patrones, determinando un patrón predominante, uno secundario y uno terciario en los casos en los que este último estuviera presente. En referencia a esto, existen diferencias respecto a los patrones encontrados que deban reportarse dependiendo del material que se está analizando, ya sea pieza quirúrgica o biopsia diagnóstica. En nuestro caso se trataba de piezas de prostatectomía, por lo que teníamos la posibilidad de valorar y no dejar escapar ningún detalle, si bien debido a los pocos casos (n=95) decidimos agruparlos en cuatro categorías.

Establecimos diferentes categorías de la siguiente manera:

- **Grupo 1:** aquellos con patrón homogéneo 3 corresponde a un Gleason 6 (3+3)
- **Grupo 2:** los que mostraban un patrón combinado con predominio de patrón 3 y patrón 4 secundario (3+4), con o sin tercer patrón 5
- **Grupo 3:** los que mostraban un patrón combinado con predominio de patrón 4 y patrón 3 secundario (4+3), con o sin tercer patrón 5
- **Grupo 4:** tumores pobremente diferenciados con un Gleason igual o mayor a 8 (4+4), 4+5), (5+4), (5+5)

Otras variables morfológicas estudiadas con una influencia pronóstica independiente en el periodo libre de enfermedad fueron:

- la extensión extraprostática del tumor (EEP)
- el estado de los márgenes quirúrgicos (MQ)
- la invasión de las vesículas seminales (VS)

La extensión extraprostática se define como la presencia de glándulas tumorales fuera de la glándula prostática y rodeada por células adiposas. La extensión extraprostática se dividió en dos grupos, focal (EEPf) si se observaba tumor únicamente en un campo de gran aumento (CGA) o extensa (EEPe) ocupaba más de un campo de gran aumento (CGA).

El estado de los márgenes quirúrgicos se consideró positivo si se identificaban células tumorales en contacto con la tinta china. Y negativo si al menos se observaba tejido conectivo o glándulas normales entre el margen tintado y las células tumorales.

El nivel de invasión de la cápsula fue subdividido en tres categorías según su extensión, considerando como C0 aquellos tumores confinados al parénquima prostático, rodeados por acinis normales, sin invasión de la cápsula; C1 cuando se afecta la mitad interna de la cápsula prostática y C2 la mitad externa de la cápsula.

La presencia de invasión vascular y/o linfática se consideró significativa si se encontraba fuera del tumor. Émbolos endo-tumorales o invasión por continuidad no fue considerada invasión.

Se consideró invasión perineural cuando los fascículos nerviosos estaban rodeados completamente por glándulas tumorales.

El porcentaje aproximado de neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN) fue valorado en cada una de las piezas estableciendo grupos porcentuales de menor de 20%, de entre 20-40%, del 40-60% y mayor del 60%.

La localización del tumor, ya sea unilateral o bilateral, central o periférica, también fue determinada, así como el porcentaje del volumen tumoral y la presencia de carcinoma intraductal.

Otra variable morfológica estudiada y que cada vez más adquiere más importancia en otros tipos de tumores sólidos, es el infiltrado inflamatorio linfocitario asociado al tumor.

Y por último algunos de los casos en la evolución de la enfermedad desarrollaron metástasis a distancia, exclusivamente óseas, a costillas, vertebras dorsales y lumbares, cráneo, rama isquiática, sacroilíaca y fémur. Algunas de ellas tuvieron confirmación histológica, pero otras solo mediante estudio de extensión radiológico.

Algunos de nuestros pacientes también desarrollaron segundas neoplasias en otros órganos. Cuatro de ellos desarrollaron carcinomas uroteliales, un carcinoma renal, dos adenocarcinomas gástricos, un adenocarcinoma de páncreas, un colangiocarcinoma, un mesotelioma, dos adenocarcinomas de colon, un síndrome de paraproteína IgG kappa, un síndrome mieloproliferativo JAK2+, una leucemia aguda mieloide sobre síndrome mielodisplásico

A todos los pacientes se les realizó linfadenectomía bilateral reglada. Solo dos pacientes presentaron metástasis ganglionares en 1 ganglio linfático.

3.1.4 Selección de tejido para realización de las matrices tisulares (tissue-microarrays)

Posterior a esta evaluación se procedió seleccionar zonas al microscopio óptico marcadas con rotulador, que fueran representativas de los distintos patrones del tumor, que se habían determinado para cada uno de los casos.

Se seleccionaron entre 2-3 zonas de cada tumor, que fueron extraídas de forma automatizada utilizando una plataforma de micro-disección de tejido HTS (Galileo TMA CK Series modelo 2500). Mediante una aguja hueca se extrajeron cilindros de tejido de 1 mm de diámetro, de las regiones previamente seleccionadas para micro-disección del tejido (TMA), con un total de 555 zonas tumorales extraídas y colocadas de forma ordenada en un bloque de parafina, cuya ubicación fue extrapolada, creando un mapa digital con el que podíamos saber exactamente a qué caso correspondía. Se confeccionaron un total de 3 bloques de parafina (TA1777, TA1778, TA1779).

3.2 Técnicas de Inmunohistoquímicas

De los bloques de parafina se realizaron cortes a 3 micras, utilizando un micrótopo. Se realizó tinción de hematoxilina-eosina de cada uno de ellos para confirmar la presencia de células tumorales y 5 cortes adicionales de 3 micras montadas sobre cristales portaobjetos con carga electrostática, para su posterior proceso de desparafinización, hidratación con xilol y alcoholes en gradación decreciente (100°, 96°, 70°) y agua bidestilada. Los cortes debidamente colocados en portaobjetos especialmente preparados para las inmunotinciones tuvieron un proceso previo consistente en una recuperación antigénica a alta temperatura en presencia de un tampón de EDTA a pH 9 de Dako. Tras esta recuperación antigénica, los portaobjetos fueron incubados con el anticuerpo primario correspondiente y a continuación, con los polímeros conjugados con anti-Ig de caballo y rábano apropiados (Flex+, Dako). La visualización de las secciones teñidas se realizó con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina. Todas estas tinciones se ejecutaron utilizando el autoteñidor Dako Autostainer.

Los anticuerpos utilizados fueron:

- MKP-1 sc-1102 (Santa Cruz Biotechnology)
- MKP-3sc-377070 (Santa Cruz Biotechnology)
- JNK pAb, Rabbit, (pTPpY) (Promega)
- PHO-P44/42MAPK(THR202/TYR204)D13.14.4E 1674370S (Izasa)
- PHOSPHO-P38 MAPK(THR180/TYR182)(D3F9) 1674511S (Izasa)

3.3 Valoración de los marcadores inmunohistoquímicos

Las tinciones inmunohistoquímicas fueron revisadas por dos patólogos con desconocimiento de los datos clínicos, así como del grado tumoral y de la asociación entre los distintos casos.

Sobre esta base se valoró la expresión de cada uno de los marcadores.

La expresión de MKP-1 y las formas fosforiladas de MAPK, p38 y JNK fueron valoradas en el núcleo de las células tumorales.

La expresión de la forma fosforilada de ERK fue valorada en el núcleo y citoplasma y MKP-3 en el citoplasma de las células tumorales.

Para dar un valor cuantitativo al de expresión de estos marcadores, se calculó mediante una escala de expresión semi-cuantitativa o Histo-score (H-score), en el que se considera el porcentaje de células con expresión y la intensidad de la expresión. La intensidad se evalúa en 4 categorías, siendo 0 un valor negativo, 1 una tinción débil, 2 una tinción intermedia y 3 una tinción fuerte o intensa. El Histo-score se calcula aplicando un factor de corrección al porcentaje en cada una de las intensidades de expresión, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$H\text{-score} = (\text{expresión baja } \%) \times 1 + (\text{expresión intermedia } \%) \times 2 + (\text{expresión fuerte } \%) \times 3$$

Los resultados de esta fórmula oscilan en un rango que varía entre 0 y 300.

Como comentamos anteriormente en el apartado de selección de material se seleccionaron algunas muestras de tejido prostático normal, así como de glándulas correspondientes a zonas de hiperplasia glandular y neoplasia intraepitelial prostática de alto grado, con la finalidad de valorar la expresión de estos marcadores en tejido no tumoral y poder contrastarlo.

3.4 Seguimiento

Los pacientes fueron seguidos por el Servicio de Urología, mediante determinaciones del PSA cada año. La mediana de seguimiento de la serie ha sido 173.5 meses (rango 7-205) hasta la finalización del estudio en 2010.

De los 95 pacientes incluidos, dos fallecieron 4 años posteriores a la cirugía tras haber desarrollado metástasis óseas, uno en vértebras dorsales y en el otro paciente desconocemos la localización. Otro paciente falleció por una encefalitis herpética cuatro años después de la cirugía, pero su enfermedad ya había recidivado con metástasis óseas, un año después de la PR. Y otro falleció por causas que desconocemos.

3.5 Estudio estadístico

Los datos de los pacientes fueron informatizados tras su correspondiente anonimización en una tabla Excel para su posterior análisis con el programa estadístico SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

El análisis descriptivo de las variables se realizó con porcentajes para las variables cualitativas y con medias o medianas y rangos para las cuantitativas.

El análisis bivariable de asociación entre variables se realizó con la prueba t de Student para comparación de medias de variables cuantitativas entre dos grupos y la χ^2 cuadrado para valorar la asociación entre variables cualitativas.

En las determinaciones de las cohortes de biopsias de pacientes, se realizaron diferentes análisis relacionando las características clínicas e inmuohistoquímicas de los pacientes con los marcadores de interés (MKP-1, MKP-3, ERK, JNK, p38).

La supervivencia global (OS) se definió como el tiempo desde el diagnóstico del tumor a la fecha de fallecimiento por cualquier causa pérdida de seguimiento. La supervivencia libre de enfermedad (DFS) se definió como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico del tumor hasta el primer evento acontecido, considerándose como eventos posibles: recaídas en cualquier localización, muerte o pérdida de seguimiento.

Las comparaciones de supervivencia de Kaplan-Meier se realizaron con la prueba de Mantel-Cox. El modelo de riesgo proporcional de Cox se ajustó considerándose parámetros significativos en el análisis univariante.

En todos los casos se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4.1 Descripción de la serie

4.1.1 Variables clínicas

Todas las variables clínicas a continuación descritas fueron adquiridas de las historias clínicas de los 88 pacientes de los que tuvimos acceso a la historia clínica gracias a la colaboración del departamento de archivo del Hospital Gregorio Marañón.

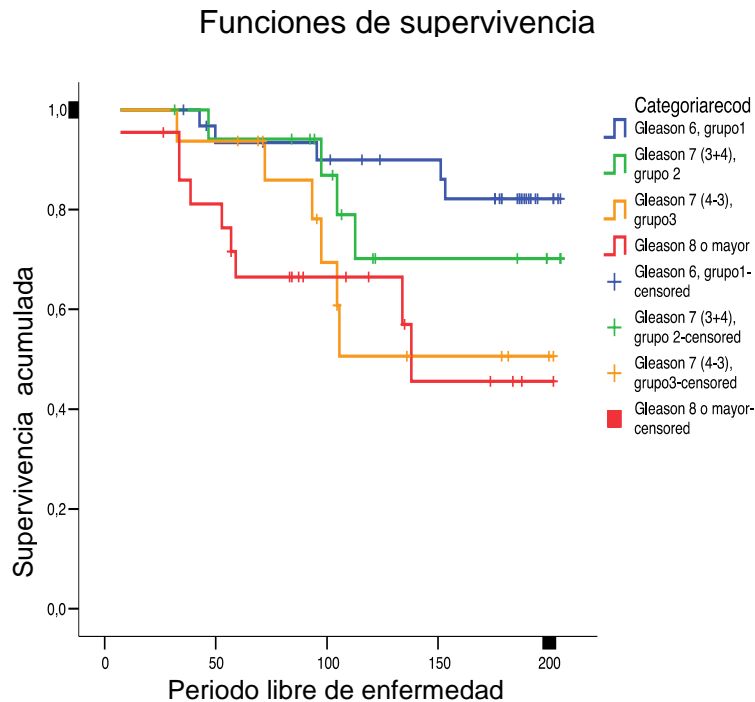
- *La media de edad en el momento de la cirugía fue 64 años (rango 45-74).*
- *El nivel medio de PSA prequirúrgico era de 13,3 ng/dl (rango 5,2-430).*
- *Al momento del diagnóstico la gran mayoría de los pacientes se encontraba en un estadio clínico pT2c (20 casos, 25,6 %). El resto de casos se distribuían de la siguiente manera: pT1c (2 casos, 2,6%), pT2a (13 casos, 16,7%), pT2b (6 casos, 7,7%), pT3a (12 casos, 15,4%), pT3b (13 casos, 16,7%) y pT3c (9 casos, 11,5%). Solo el 3 casos (3,8%) tenían un estadio inferior a pT1c.*
- *47 casos (53,4%) tuvieron recaída bioquímica de la enfermedad, con niveles de PSA postoperatorio por encima de 0,2 ng/ml, lo que se considera por encima del nivel normal, en una mediana de tiempo de 84,18 meses (rango de 1-205 meses). 41 pacientes (46,6%) se mantuvieron con niveles postoperatorios normales de PSA.*
- *Ningún paciente presentaba metástasis al momento del diagnóstico.*

4.1.2 Variables morfológicas

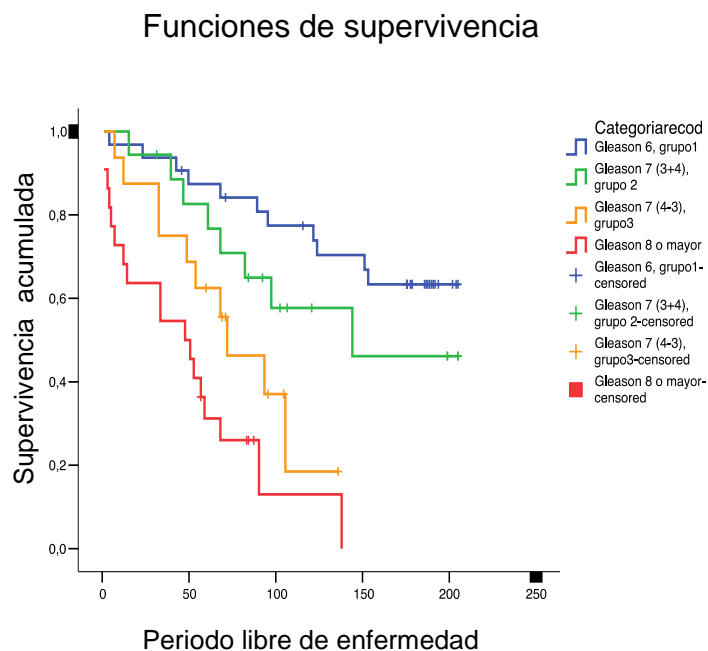
Las variables morfológicas que a continuación describiremos, proceden del análisis anatomopatológico de las piezas de PR estudiadas por dos patólogos con un total de 95 casos.

- *El patrón de Gleason más prevalente era el Gleason 6: 36 casos. El resto estaban distribuidos de la siguiente manera, Gleason 7 (3+4): 19 casos, Gleason 7 (4+3) con 18 casos y Gleason 8 o mayor con 22 casos.*
- *De los 95 casos, 75 (78,9%) de los tumores tenían una localización bilateral, del resto 12 (12,6%) se localizaban en el lóbulo derecho y 8 (8,4%) se localizaban en el lóbulo izquierdo.*
- *La extensión extraprostática (EEP) se observó en 35 casos (36,8%), la mayor parte de ellos, 33 casos (34,7%) tenían una afectación focal (EEPf) y solo 2 casos (2,2%) mostraban afectación además de un campo de gran aumento, lo que se consideraba según nuestros criterios como una afectación extensa (EEPe).*

- 31 casos tenían invasión de las vesículas seminales (32,6%).
- Las invasiones linfáticas eran más frecuentes que las vasculares, observándose invasiones linfáticas en 62 casos (65,3%) casos y en 30 casos (31,6%) invasiones vasculares.
- La invasión capsular se identificó en 91 (95,8%) casos, en 78 (98,9%) de ellos infiltraba más del 50% de espesor del tejido fibroso que rodea la glándula.
- La invasión perineural era la norma, estaba presente en 86 casos (90,5%).
- La neoplasia intraepitelial prostática (PIN) se determinó en el 84,2% de los casos. De estos, el 71,6% de los casos mostraba un volumen de PIN inferior al 20% del total en la pieza de prostatectomía y 77,9% tenían una distribución bilateral.
- El carcinoma intraductal se identificó en 15 casos, en un volumen inferior al 5% y todos estaban asociados a tumores de alto grado.
- Los márgenes de resección estaban con frecuencia afectados en observándose glándulas en contacto con el margen tintado en 43 casos (45,3%).
- En solo 2 pacientes se identificó metástasis ganglionar de adenocarcinoma en la pieza de linfadenectomía. En cada paciente solo había afectación de un ganglio (2,1%).



Gráfica 1. Curva de supervivencia de las diferentes categorías de Gleason de nuestra serie de pacientes con carcinoma de próstata. $p=0,027$



Gráfica 2. En esta grafica de supervivencia se observan claras diferencias entre las diferentes categorías de Gleason, observándose un peor comportamiento a medida que grado histológico aumenta ($p=0,000$).

4.2 Interpretación de los resultados de las técnicas inmunohistoquímicas:

Cuando se evaluaron los distintos anticuerpos inmunohistoquímicos obtuvimos los siguientes resultados:

4.2.1 Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre expresión de la forma fosforilada de ERK (pERK) y la fosfatasa MKP-3 con las diferentes categorías de Gleason.

De los 94 casos que expresan pERK, había un claro predominio de los pacientes que mostraban baja expresión (72 casos), estos se encontraban distribuidos en todos los grupos. El grupo 1 tenía mayor cantidad de tumores con expresión baja y alta de pERK, si bien en este grupo se encontraba la gran mayoría de la del total de pacientes serie.

En el grupo 3 y 4 había también una alta prevalencia de baja expresión. En el grupo 4, había 4 pacientes con alta expresión de pERK. Los cuatro pacientes tuvieron recidiva bioquímica de la enfermedad en un periodo corto de tiempo (4 meses, 5 meses, 9 meses y 14 meses) lo que podría asociarse a las características de proliferación celular y crecimiento tumoral propias de esta proteína pERK ($p=0,026$).

Tabla 1. Relación de la expresión de pERK con las diferentes categorías de Gleason.

	pERK		
Categoría	Baja expresión	Alta expresión	Total
Grupo 1 Gleason 6 (3+3)	25(69,4%)	11 (30,6%)	36 (38,3%)
Grupo 2 Gleason 7 (3+4)	11 (61,1%)	7 (38,9%)	18 (19,1%)
Grupo 3 Gleason 7 (4+3)	18 (100%)	0 (0%)	18 (19,1%)
Grupo 4 Gleason 8 o mayor	18 (81,8%)	4 (18,2%)	22 (23,4%)
Total	72 (76,6%)	22 (23,4%)	94 (100%)

De los 95 casos que expresaban MKP-3, 53 casos mostraban baja expresión y 42 casos alta expresión. De estos la gran mayoría de los casos que mostraban alta expresión estaban en los grupos 1 y 2 de Gleason 6 y 7 (3+4), con solo 5 casos en el grupo 3 de Gleason 7 (4+3) y 1 caso en el grupo 4 de Gleason 8 o mayor ($p=0,000$).

Tabla 2. Relación de la expresión de MKP-3 con las diferentes categorías de Gleason.

	MKP-3		
Categoría	Baja Expresión	Alta expresión	Total
Grupo 1 Gleason 6 (3+3)	12 (33,3)	24 (66,7%)	36 (37,9%)
Grupo 2 Gleason 7 (3+4)	6 (33,3%)	12 (66,7%)	18 (18,9%)
Grupo 3 Gleason 7 (4+3)	14 (73,7%)	5 (26,3%)	22 (23,2%)
Grupo 4 Gleason 8 o mayor	21 (39,6%)	1 (2,4%)	22 (23,2%)
Total	53 (55,8%)	42 (44,2%)	95 (100%)

No se encontró una relación estadísticamente significativa entre las formas fosforiladas de JNK y p38 con los diferentes grupos de las categorías de Gleason. Sin embargo de los 95 casos que expresaron pp38, 60 casos (63,2%) tenían baja expresión y 35 casos (36,8%) alta expresión. pJNK tenía un comportamiento similar, con predominio de la baja expresión en todas las categorías. De los 93 casos que lo expresaban, 58 (62,4%) tenían baja expresión y 35 (37,6%) alta expresión.

Esto podría explicarse por la función fisiológica de pJNK y pp38. Estas son quinasas que tienen principalmente una función pro-apoptótica, si bien esto depende del estímulo, por lo que la actividad de estas proteínas está disminuida durante la fase de crecimiento tumoral y en la enfermedad avanzada, lo que explica la baja expresión de pJNK y pp38, en relación a una disminución de la apoptosis tumoral.

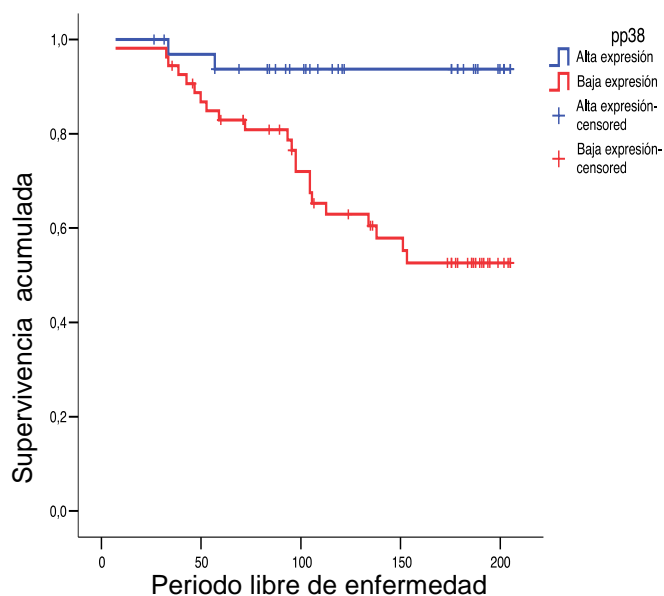
4.2.2 Se determinó una asociación estadísticamente significativa entre la baja expresión de las formas fosforiladas de p38 y ERK, y la supervivencia libre de enfermedad

De los 88 pacientes que expresaban pp38, la gran mayoría de los pacientes mostraban una baja expresión, estos a su vez tuvieron un mayor número de recaídas bioquímicas de la enfermedad como se puede observar en la tabla 3. Esta baja expresión se relacionaba con una un periodo libre de enfermedad más corto, como se puede ver en la gráfica de supervivencia de Kaplan Meier (Gráfica 3)($p=0,002$).

Tabla 3. Relación de casos con expresión de pp38 y numero de eventos

pp38		
	Total de casos	Eventos
Baja expresión	54	22
Alta expresión	34	2
Total	88	24

Funciones de supervivencia

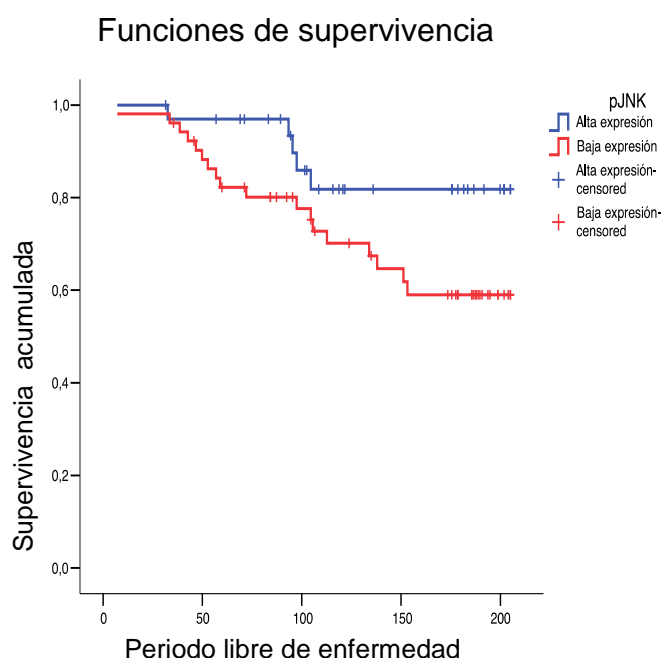


Gráfica 3. Curva se supervivencia de Kaplan Meier en que se muestra la correlación entre la baja expresión de pp38 y un periodo libre de enfermedad más corto.

De los 86 casos que expresaban pJNK, la gran mayoría mostraban baja expresión y el mayor número de recaídas de la enfermedad se produjeron dentro de este grupo de pacientes con baja expresión de la forma fosforilada de JNK (tabla 4). Si bien no hemos obtenido un resultado estadísticamente significativo, vemos que la tendencia es similar a la de pp38 y se correlaciona con un peor evolución clínica de la enfermedad como podemos observar en la curva de Kaplan Meier (gráfica 4) ($p=0,06$).

Tabla 4. Relación de casos con expresión de pJNK y número de eventos

pJNK		
	Total de casos	Eventos
Baja expresión	52	18
Alta expresión	34	5
Total	86	23



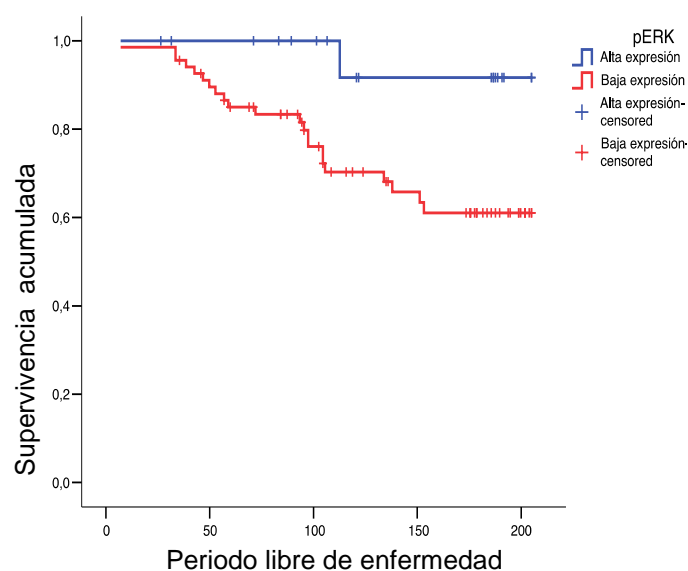
Gráfica 4. Curva se supervivencia de Kaplan Meier en que se muestra la correlación entre la baja expresión de pJNK y un periodo libre de enfermedad más corto.

De los 87 pacientes que expresaban pERK, la gran mayoría de los pacientes mostraban baja expresión y tuvieron el mayor número de recaídas bioquímicas de la enfermedad (tabla 5), con un periodo libre de enfermedad más corto como se puede observar en la gráfica de supervivencia de Kaplan Meier (gráfica 5) ($p=0,032$).

Tabla 5. Relación de casos con expresión de pERK y numero de eventos

pERK		
	Total de casos	Eventos
Baja expresión	68	22
Alta expresión	19	1
Total	87	22

Funciones de supervivencia



Gráfica 5. Curva se supervivencia de Kaplan Meier en que se muestra la correlación entre la baja expresión de ERK y un periodo libre de enfermedad más corto.

4.2.3 La baja expresión de MKP-3 guarda relación con un periodo de recidiva bioquímica más corto en cáncer de próstata

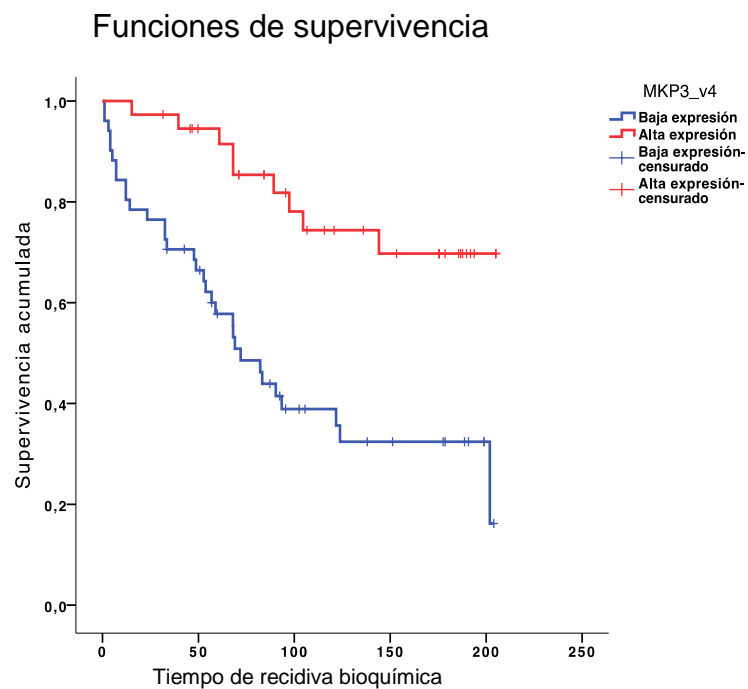
Las distintas categorías de los patrones de Gleason son un reflejo del grado de diferenciación tumoral y guardan íntima relación con el comportamiento biológico y la supervivencia libre de enfermedad.

De los 90 pacientes que expresaban MKP-3, 51 pacientes mostraban baja expresión y 39 alta expresión. De los casos con baja expresión 32 pacientes tuvieron recaída bioquímica de la enfermedad (tabla 6).

Tabla 6. Relación entre MKP-3 y el periodo de recidiva bioquímica.

	MKP 3		
	Libre de enfermedad	Recaída Bioquímica	Total
Baja expresión	19 (37,3%)	32 (62,7%)	51 (56,7%)
Alta expresión	30 (76,9%)	9 (23,1%)	39 (43,3%)
Total	49 (54,4%)	41 (45,6%)	90 (100%)

En nuestra serie de 95 pacientes con cáncer de próstata de los cuales 90 expresaban MKP-3, se encontró una relación estadísticamente significativa entre la expresión de MKP-3 y el periodo de recidiva bioquímica, siendo este más corto en los pacientes que mostraban baja expresión de MKP-3, según podemos ver en el gráfico de supervivencia de Kaplan Meier (gráfica 6) ($p=0,000$)



Gráfica 6. Curva se Función de supervivencia de Kaplan Meier que muestra una correlación de entre la baja expresión de MKP-3 y un tiempo de recidiva bioquímica más corto.

4.2.4 La baja expresión de MKP-3 guarda relación con un periodo libre de enfermedad más corto

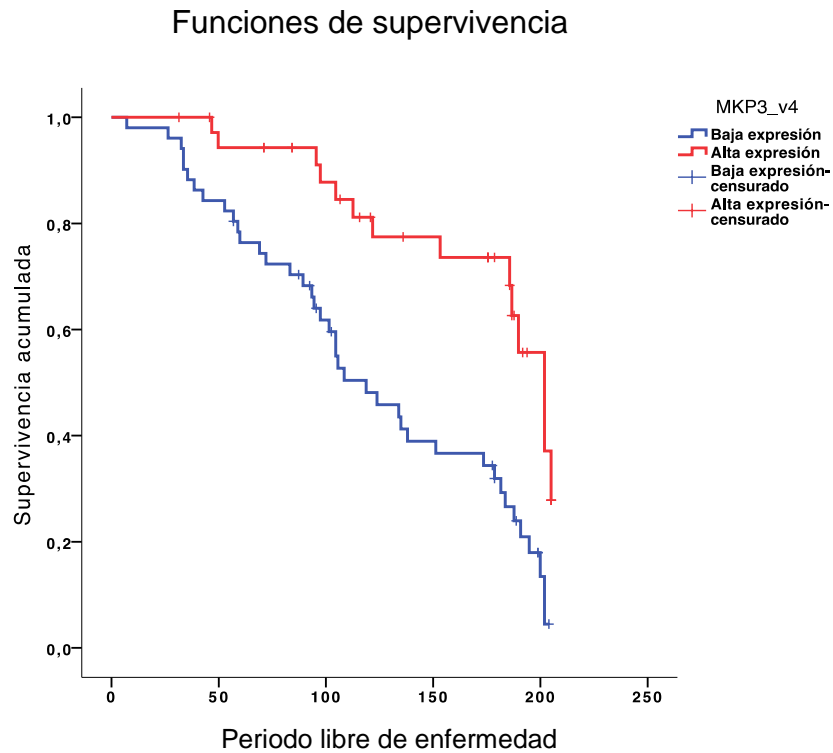
Se ha determinado una asociación estadísticamente significativa entre la baja expresión de MKP-3 y el periodo libre de enfermedad.

De los 88 pacientes que expresaban MKP-3, 54 pacientes tuvieron recaída de la enfermedad, de las cuales el 40 correspondían al grupo con baja expresión de MKP-3 (tabla 7). Entendemos como recaída de la enfermedad cualquier evento relacionado con el cáncer de próstata, recaída bioquímica, recidiva tumoral, enfermedad metastásica o muerte. Todos tenían en común una baja expresión de MKP-3. No falleció ningún paciente con alta expresión de MKP-3.

Tabla 7. Relación entre MKP-3 y el periodo libre de enfermedad.

	MKP 3		
	Libre de enfermedad	Eventos	Total
Baja expresión	11 (21,6%)	40 (78,4%)	51 (58%)
Alta expresión	23 (62,2%)	14 (37,8%)	37 (42%)
Total	34 (38,6%)	54 (61,4%)	88(100%)

En la curva de supervivencia de Kaplan Meier se observa como el grupo de pacientes con una baja expresión de MKP-3 tiene una peor evolución clínica con un periodo libre de enfermedad más corto, comparado con el grupo que conserva una alta expresión de MKP-3 ($p=0,000$).



Gráfica 7. Curva de función de supervivencia de Kaplan Meier que muestra una correlación entre la baja expresión de MKP-3 y un periodo libre de enfermedad más corto.

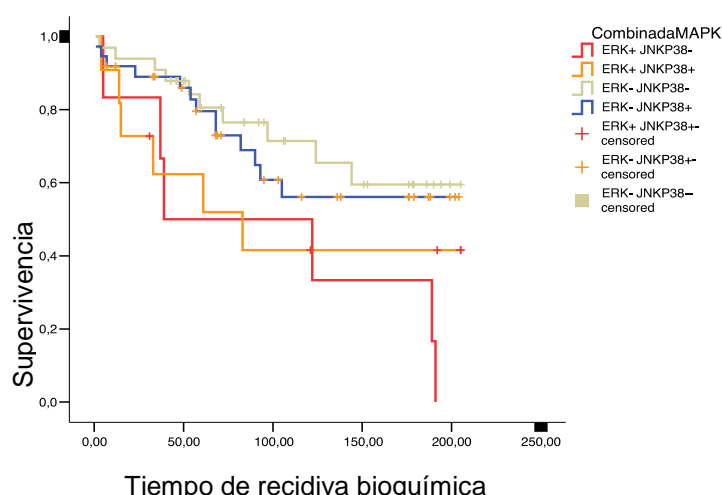
4.2.5 Se ha determinado una relación entre la expresión o ausencia de expresión entre las formas fosforiladas de ERK y JNKp38 con el periodo de recidiva bioquímica.

Se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre la expresión o ausencia de expresión de la forma fosforilada de ERK y las formas fosforiladas de las quinasas pro-apoptóticas JNK/p38 (tabla 8), que nos ha permitido categorizar diferentes grupos de expresión. El grupo más prevalente que representa a la gran mayoría de nuestros pacientes corresponde al grupo que no expresa pERK y si expresa pJNKpp38 (37 pacientes), con un total de 10 recaídas de la enfermedad en este grupo. Los grupos que expresan ERK con o sin expresión de pJNKpp38 tienen un periodo de recidiva bioquímica más corto comparado con el resto de grupos como se puede observar en la curva de supervivencia de Kaplan Meier (gráfica 8) ($p=0,029$).

Tabla 8. Diferentes grupos de expresión de pERK comparados con pJNKpp38

	Total	Nº eventos
pERK- pJNKpp38-	33	10
pERK- pJNKpp38+	37	13
pERK+ pJNKpp38+	11	6
pERK+ pJNKpp38-	6	6
Total	87	35

Funciones de supervivencia



Gráfica 8. Curva se Función de supervivencia de Kaplan Meier se observa la relación de los grupos que expresan ERK asociados o no a expresión de JNKp38 con un periodo de recidiva bioquímica más corto

4.2.6 La baja expresión de MKP-3 se asocia de forma significativa a cáncer de próstata con evolución a un fenotipo andrógeno independiente

Determinamos cuales casos correspondían a pacientes que habían recibido terapia de ablación androgénica por recidiva de la enfermedad y que a pesar de haber sido tratados, la enfermedad había persistido.

Al estudiar la expresión de MKP-3 determinamos que 17 casos del total de 20 pacientes con CaPAI (tabla 9) mostraban una baja expresión de MKP-3. Estableciendo una relación estadísticamente significativa con la baja expresión y el carcinoma de próstata andrógeno independiente ($p=0,003$).

En la tabla 10 podemos observar los casos de carcinoma de próstata con independencia androgénica y su correlación con la expresión de las distintas formas fosforiladas de MAPK y la fosfatasa MKP-1

Tabla 9. Carcinomas de próstata andrógeno independiente con predominio de la baja expresión de MKP-3.

Cáncer de próstata andrógeno independiente (CaPAI)			
MKP-3	Sensible	Hormono-resistente	Total
Baja expresión	36 (67,9%)	17 (32,1%)	53 (55,8%)
Alta expresión	39 (92,9%)	3 (7,1%)	42 (44,3%)
Total	75 (78,9%)	20 (21,1%)	95(100%)

Tabla 10. Casos de CaPAI y su correlación con el patrón de expresión de MAPKs y MKP-3

Carcinomas de próstata andrógeno independientes (n=20)	Baja expresión	Alta expresión
pp-38 (n=20)	15 (75 %)	5 (25%)
MKP-3 (n=20)	17 (32,1%)	3 (7,1%)
pERK (n=19)	16 (84,2%)	3 (15,8%)
pJNK (n=19)	10 (52,6%)	9 (47,4%)

4.2.7 Asociación de las variables morfológicas estudiadas con los distintos marcadores.

Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN)

La neoplasia intraepitelial era un hallazgo frecuente en nuestras biopsias o piezas quirúrgicas de cáncer de próstata observándose en el 84, 1% de las piezas de prostatectomía. 71,6% de los casos en nuestra serie tenían volumen de PIN inferior al 20% del total de la pieza de prostatectomía con una distribución predominantemente bilateral. La siguiente tabla resume de forma muy esquemática el patrón de expresión de las distintas MAPKs y MKP-3 en PIN (tabla 11). No se demostró una asociación significativa entre estos marcadores un PIN.

Tabla 11. Relación de la neoplasia intraepitelial prostática con las distintas MAPK y MK-3.

PIN	Baja expresión	Alta expresión	Total casos +
MKP-3 (n=95)	31 (39,2%)	48 (60,8%)	80
pERK (n=94)	59 (74,7%)	20 (25,3%)	79
pp-38 (n=94)	49 (61,3%)	31 (38%)	80
pJNK (n=93)	49 (84,5%)	30 (15,5%)	79

Invasión de vesículas seminales

Se encontró una relación estadísticamente significativa con la expresión de MKP-3 y la invasión de las vesículas seminales. De los 94 casos con expresión de MKP-3, 31(33%) casos tenían invasión de las vesículas seminales ($p=0,009$), si bien esto va ligado más probablemente al grado de agresividad propio del tumor.

Invasión linfática

La única relación significativa a la invasión linfática fue con la baja expresión de MKP-3. De los 94 casos con expresión de MKP-3, 61 (64,9%) casos presentaban invasión linfática ($p=0,020$).

Inflamación asociada al tumor

La inflamación crónica era otro hallazgo muy frecuente en nuestras biopsias. 62 casos tenían algún grado de inflamación crónica. Todos los casos expresaban MKP-3, JNK, p38 y ERK.

No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los distintos marcadores con:

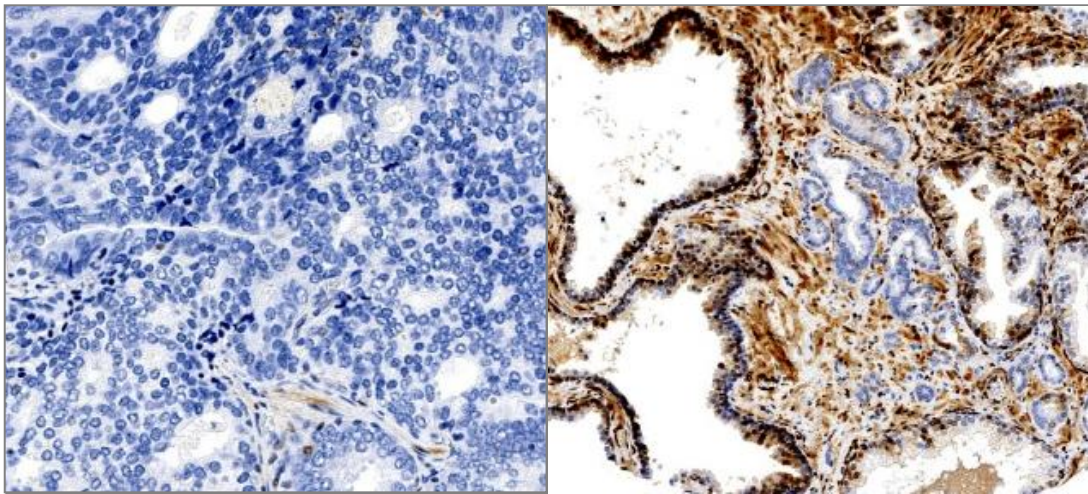
- neoplasia intraepitelial prostática
- carcinoma intraductal
- inflamación asociado al tumor
- invasión de la capsula
- extensión extraprostática

MKP-1 era otra de las fosfatasa objetivo de nuestro estudio, sin embargo los resultados obtenidos, nos han sido los esperados. El hallazgo de la expresión citoplásmica de MKP-1 en nuestras muestras de adenocarcinoma, en ausencia de expresión nuclear, no está descrito en la literatura. Solo uno de los casos mostró dudosa tinción nuclear. Debido a esto no pudimos dar valor a esta tinción ya que MKP-1 es una quinasa nuclear específica, pero la sobre-expresión citoplásmica se mostraba de manera granular tosca en algunas glándulas normales y en células de PIN, así como en algunos adenocarcinomas bien diferenciados, para después volverse homogénea en el citoplasma, adquiriendo intensidades de expresión variables que no sabemos como interpretar. Este patrón de tinción citoplásmica es similar al descrito por el laboratorio Santa Cruz Biotechnology, Inc. con este anticuerpo, en células de los túbulos renales del riñón, pero siempre asociada a tinción nuclear.

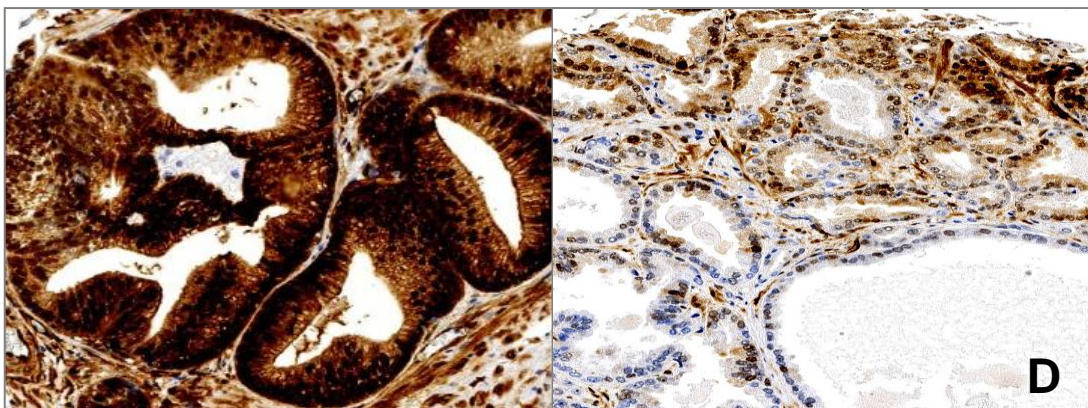
Creemos que es necesario investigar más acerca de este hallazgo, aclarar si se trata simplemente de un fallo en la fijación del material, ya que en los años 1990 se utilizaban otros medios de fijación diferentes al formol, o bien si el anticuerpo no ha sido adecuadamente diluido o el tejido correctamente procesado. Por todo esto consideramos que éticamente sería incorrecto dar algún tipo de resultado respecto a este marcador.

En las figuras de 8-11 se observan los distintos patrones de expresión de las MAPK (pERK, p38, pJNK) y MKP-3.

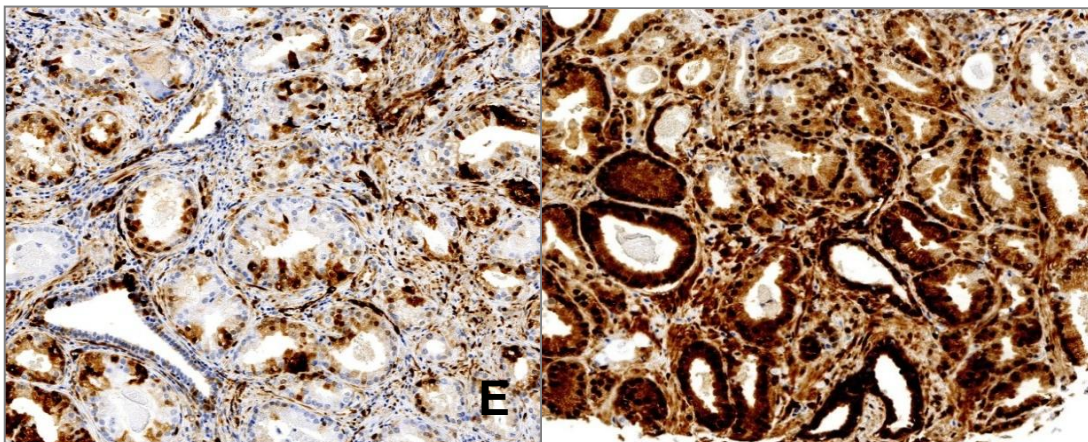
Figura 8. Patrones de expresión IHQ de pERK en muestras de tejido prostático normal, hiperplasia, PIN de alto grado y carcinoma



A.- Glándulas tumorales sin expresión de pERK. B.- Glándulas prostáticas con hiperplasia glandular que muestran tinción nuclear para pERK. Se identifican glándulas tumorales en la zona central con expresión focal de pERK.

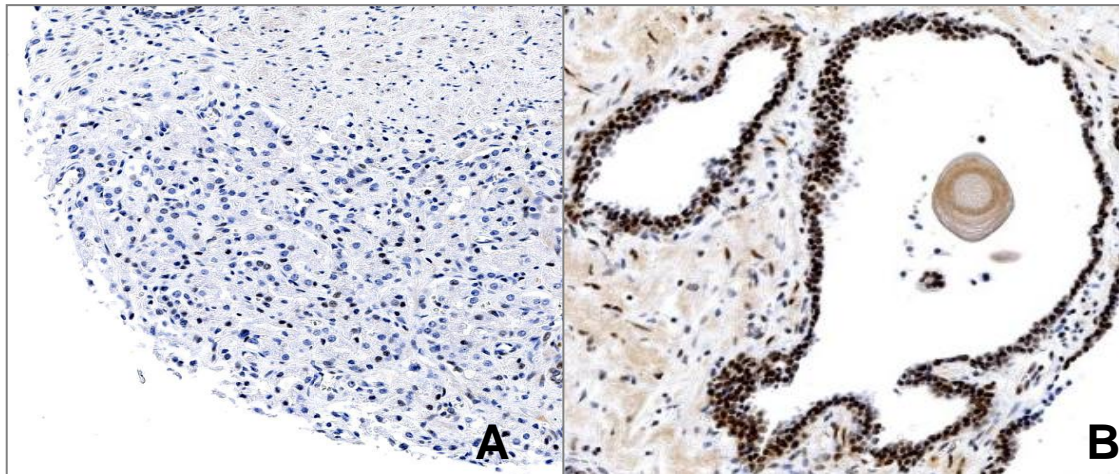


C.- Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado con sobre-expresión nuclear y citoplasmática de pERK. D.- Adenocarcinoma de próstata con leve expresión nuclear y citoplasmática de pERK.

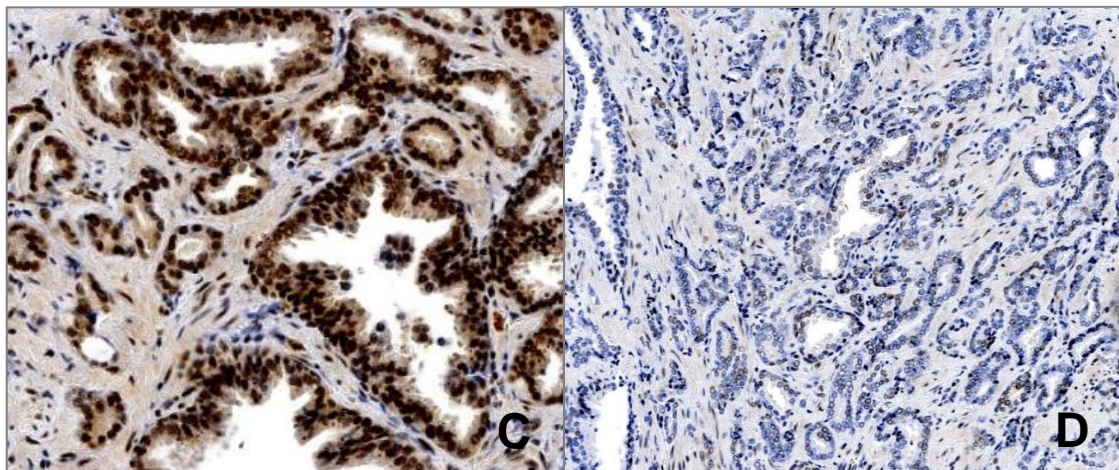


E.- Adenocarcinoma de próstata con moderada expresión nuclear y citoplasmática de pERK. F.- Adenocarcinoma de próstata con intensa expresión nuclear y citoplasmática de pERK.

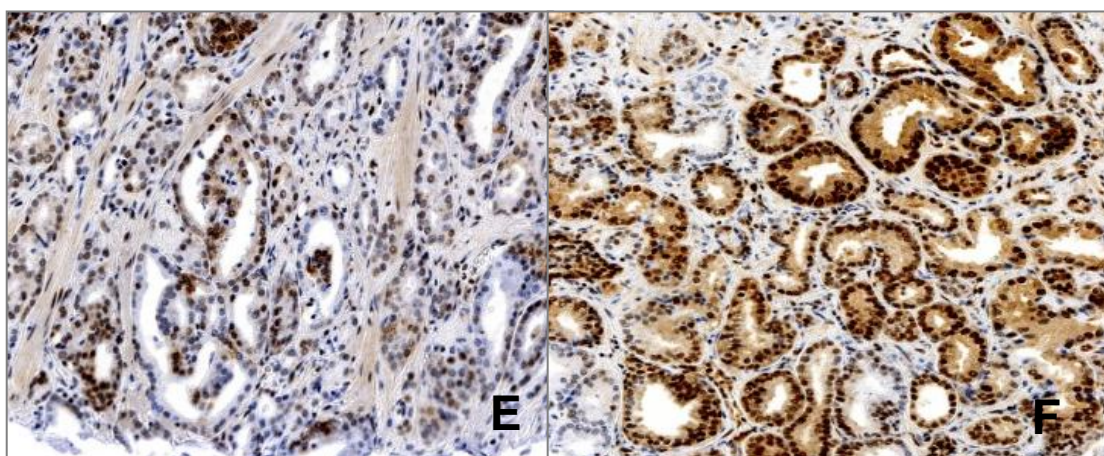
Figura 9. Patrones de expresión IHQ de pp38 en muestras de tejido prostático normal, hiperplasia, PIN de alto grado y carcinoma



A.- Glándulas tumorales sin expresión de pp38 . B.- Glándulas prostáticas normales con tinción nuclear intensa para pp38.

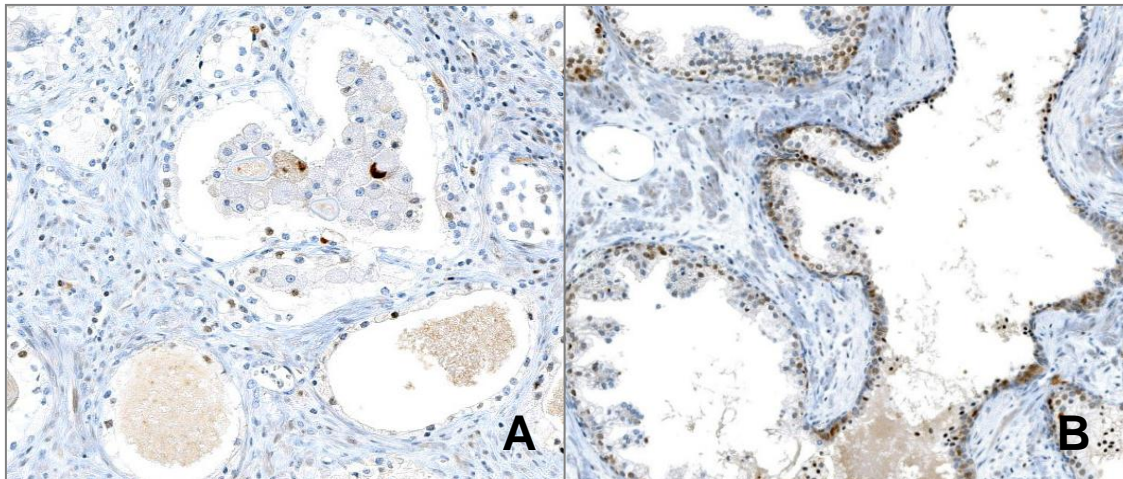


C.- Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado y adenocarcinoma con sobre-expresión nuclear de pp38. D.- Adenocarcinoma de próstata con leve expresión nuclear de pp38.

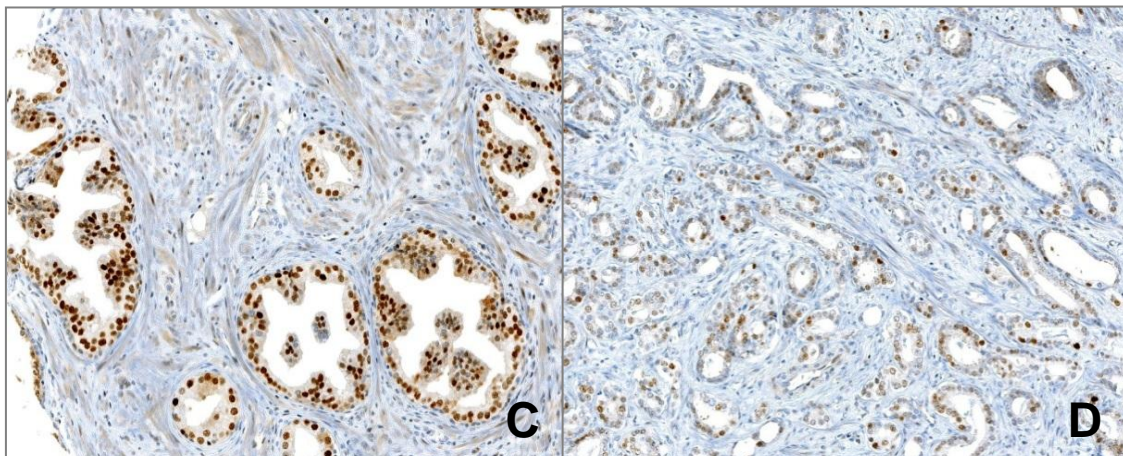


E.- Adenocarcinoma de próstata con moderada expresión nuclear de pp38. Se identifican algunos núcleos con expresión intensa. F.- Adenocarcinoma de próstata con expresión nuclear intensa de pp38.

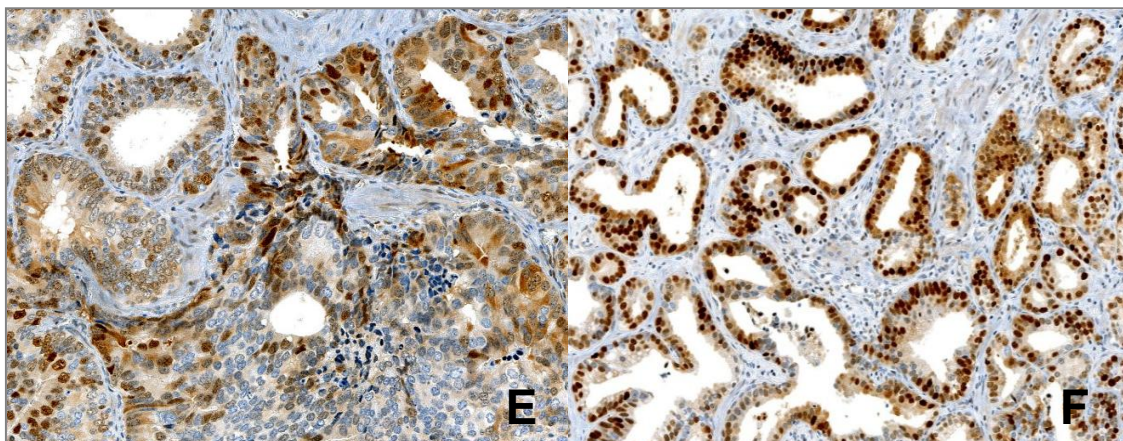
Figura 10. Patrones de expresión IHQ de pJNK en muestras de prostático normal, hiperplasia, PIN de alto grado y carcinoma



A.- Glándulas tumorales con expresión débil en aislados núcleos para pJNK
B.- Glándulas prostáticas normales y glándulas hiperplásicas con expresión nuclear débil de pJNK.

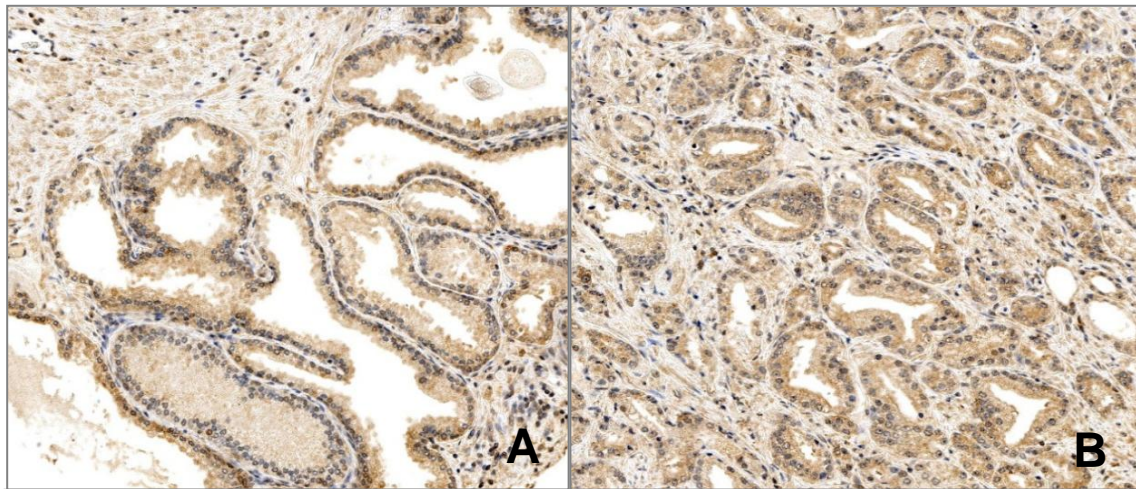


C.- Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado con sobre-expresión nuclear de pJNK.
D.- Adenocarcinoma de próstata con leve expresión nuclear de pJNK.

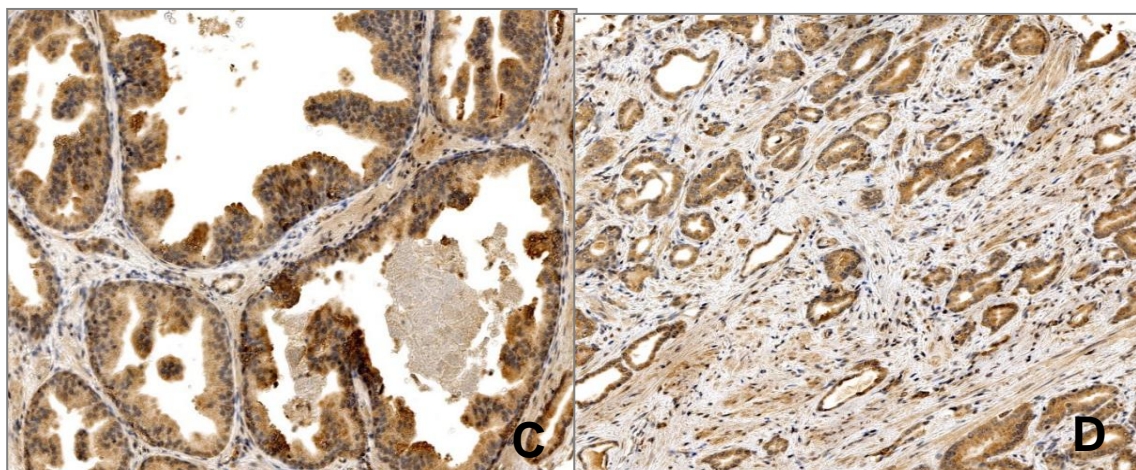


E.- Adenocarcinoma de próstata con moderada expresión nuclear para pJNK.
F.- Adenocarcinoma de próstata con expresión nuclear intensa pJNK.

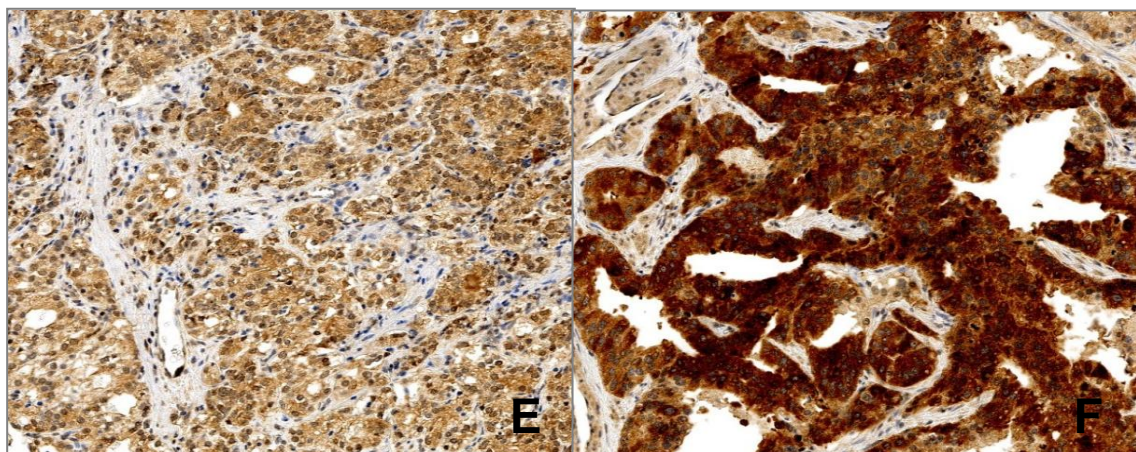
Figura 11. Patrones de expresión IHQ de MKP-3 en muestras de tejido prostático normal, hiperplasia, PIN de alto grado y carcinoma.



A.- Glándulas prostáticas benignas con expresión débil citoplásmica de MKP-3.
B.- Glándulas prostáticas con expresión débil citoplásmica de MKP-3.



C.- Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado con expresión citoplásmica intensa de MKP-3. D.- Adenocarcinoma de próstata con leve expresión citoplásmica de MKP-3.



E.- Adenocarcinoma de próstata con moderada expresión citoplásmica de MKP-3.
F.- Adenocarcinoma de próstata con intensa expresión citoplásmica de MKP-3.

DISCUSIÓN

El cáncer de próstata es la segunda neoplasia maligna más frecuente en hombres y la quinta causa de muerte en varones por malignidad en el mundo.

En el año 2012 se publicó el primer registro nacional de cáncer de próstata en España en colaboración con la Asociación Española de Urología. En este estudio revelan que la gran mayoría de los casos se diagnostican en una media de edad entre los 60-70 años, con un posterior ligero descenso, pero con un riesgo persistente de riesgo de enfermedad para toda la vida ¹⁹⁹.

Los datos obtenidos del 21,8% de la población española revelan que se diagnostican anualmente unos 19,107 casos (18,713-19,504) de cáncer de próstata solo en la sanidad pública, que probablemente sumados a los pacientes de los hospitales privados podrían llegar a ser hasta 22,000 casos nuevos anuales.

En este estudio sustentan el papel imprescindible en el diagnóstico de cáncer de próstata, basado en la confirmación histológica mediante biopsia. En 4,035 casos (98,73%) se llegó al diagnóstico mediante confirmación histológica, por lo tanto nuestro papel es fundamental en el abordaje terapéutico de estos pacientes. También describen que la mayoría de los casos son diagnosticados en estadios precoces pT1, potencialmente curables en el 90% y que solo un 1% presentan enfermedad metastásica al diagnóstico ¹⁹⁹.

Desafortunadamente en épocas pasadas el cáncer de próstata era diagnosticado en estadios avanzados, ya que es un cáncer que cursa de manera asintomática en la mayoría de los casos, solo 1 de cada 3 pacientes tienen síntomas.

Actualmente con la implementación del PSA como método de screening creemos ha aumentado el número de casos diagnosticados adenocarcinomas en estadios precoces, cuando la prostatectomía radical con intención curativa, puede ser realmente curativa para el paciente. Recientemente se ha publicado el informe Task Force de los Servicios de Prevención en EUA, en el que no encuentran ningún valor a la utilización del PSA ya que no tiene ninguna influencia en la mortalidad específica, otorgándole una categoría D (desaconseja la utilización de este servicio), por lo que no sabemos qué papel va a desempeñar el PSA en el futuro, como método de detección precoz y/o herramienta en el seguimiento de los pacientes ya diagnosticados de cáncer.

El valor del PSA normal oscila entre 0-4 ng/ml. Si bien se diagnostican cánceres de próstata con niveles inferiores a 4, aunque la gran mayoría de los casos varía entre 4-10 ng/ml, y con frecuencia niveles superiores se asocian a enfermedad avanzada o extendida. Debido a la poca especificidad del PSA, ante la alta sospecha de cáncer, el diagnóstico recae fundamentalmente en el diagnóstico histológico.

La implementación de los distintos patrones descritos por Donald Gleason en los años 1960, para categorizar en grupos los distintos tipos morfológicos de pacientes con cáncer de próstata, aún hoy sigue siendo el factor pronóstico más relevante con gran impacto en la supervivencia libre de enfermedad y la mortalidad por cáncer. A través de los años ha sufrido modificaciones, pero las bases de este sistema sólido, siguen siendo las mismas.

Los avances tecnológicos en la época moderna actual y múltiples estudios translacionales de grupos científicos, nos han proporcionado mucha información sobre las bases moleculares y genéticas de las células, sus complicados y sofisticados sistemas de comunicación y señalización, en pos del funcionamiento para el mantenimiento y supervivencia de la vida.

Actualmente se han desarrollado mapas genéticos completos de distintos tipos de cáncer, y de esta manera se han podido determinar alteraciones genéticas específicas en cada uno de ellos, que conllevan alteraciones en el desarrollo o funcionamiento de algunas moléculas. Estas moléculas a su vez pueden ser las encargadas de desencadenar reacciones en cascada a través de una vía de señalización, formar parte de ella o ser un sustrato, pero también pueden convertirse en un objetivo terapéutico.

A medida que comprendemos más este complejo sistema de funcionamiento celular, también descubrimos otras nuevas alteraciones y vías de señalización las cuales intentamos relacionar, puesto que de alguna forma, muchas de ellas parecen estar relacionadas entre sí.

El cáncer de próstata tiene un curso clínico variable y la caracterización molecular ha revelado una notable heterogeneidad mutacional, que quizás sea la explicación al comportamiento clínico tan impredecible de este cáncer.

Se han descrito múltiples vías de alteraciones en cáncer de próstata, las más frecuentes son las lesiones en PI3K y mutaciones en PTEN.

Las lesiones en la vía de señalización de PI3K son de las más frecuentes en cánceres en humanos (25-70%)³⁵. Akt es el mediador primario del inicio de la señalización de PI3K, que tiene numerosos sustratos y puede que intervenga en la inactivación de otras proteínas como B-Raf, entre algunas de ellas. Además esta vía también incluye fosfatasa que contribuyen a regular los efectos promotores de crecimiento celular de la actividad de PI3K.²⁰⁰

Las fosfatasa PTEN y SHIP-1/2 pueden remover los fosfatos de PI3K, por lo que mutaciones en estas fosfatasa permiten la progresión tumoral, por lo que los genes que las codifican son llamados genes supresores tumorales o anti-oncogénicos²⁰¹. Deleciones genómicas y mutaciones puntuales inactivantes en PTEN, un gen supresor tumoral, se producen en el 50% de los cánceres de próstata y son aún más prevalente en la enfermedad avanzada³⁴⁻³⁹.

El aumento de la expresión de la vía de Ras/Raf/MEK/ERK ha sido asociada con cáncer de próstata en estadios avanzados, independencia hormonal y mal pronóstico¹⁰⁹. Los mecanismos por los que se produce la activación de esta cascada no son del todo comprendidos, ya que no se han encontrado muchas mutaciones de Ras, Raf, MEK o ERK, y solo algunas amplificaciones en Ras han sido reportadas. De manera alternativa la vía de Ras/Raf/MEK/ERK podría estar inducida por factores de crecimiento autocrinos o paracrinos en cáncer de próstata²⁰².

Estudios en líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP y PC3) portadoras de mutaciones de PTEN, muestran altos niveles de Akt activo y bajos niveles de los miembros activos de la vía Raf/MEK/ERK. Estas líneas celulares de cáncer de próstata

avanzado con independencia androgénica muestran bajos niveles de las formas activas de Ras, MEK y ERK. Es posible que la vía Raf/MEK/ERK este bloqueada por presencia de una delección en el gen de PTEN. PTEN normalmente regula Akt y en algunas líneas celulares Akt puede fosforilar Ras-1 inhibiendo su actividad.

La disminución de la expresión de vía Raf/MEK/ERK también puede ser por delección o inactivación de p53, que están presentes en un 70% de los cánceres de próstata³⁷⁻³⁹.

p53 es un gen supresor tumoral, una de sus dianas transcripcionales es EGF. Puede activar EGR que a su vez activa la vía de Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt, lo que sugiere que p53 puede activar vías de supervivencia que afectan el balance entre la vida y la muerte en respuesta a estrés celular²⁰³.

p53 puede alterar la expresión de las fosfatasa que regulan la actividad de la vía Raf/MEK/ERK o estimular la transcripción de los genes de Raf/MEK/ERK. También puede influir en la vía de Raf/MEK/ERK dependiendo del estímulo²⁰³. Si se produce un daño en ADN p53 activa DUSP5, PAC1 u otra fosfatasa que sirva para regular la vía Raf/MEK/ERK. En cambio si el estímulo es de factores de crecimiento como EGF, entonces se activa MKP-1 u otra fosfatasa que active la vía de Raf/MEK/ERK.

En los últimos años se ha descrito y dado gran importancia al papel que desempeñan las MAPK quinasas en la regulación del ciclo celular y se ha destacado su implicación en el desarrollo de múltiples neoplasias, entre ellas el cáncer de próstata. Dentro de esta gran familia encontramos una de sus vías, Raf/MEK/ERK, de la que hemos hablado en los párrafos anteriores, cuya quinasa efectora final ERK, está relacionada con funciones de proliferación celular y desarrollo tumoral. Esta familia a su vez está compuesta por diferentes cascadas, que interaccionan entre ellas y con otras vías de señalización distintas, como las anteriormente mencionadas y otras no comentadas, convirtiendo este sistema de comunicación tan complejo, equilibrado y auto-regulable, que aún no terminamos de conocer.

Debido a lo anteriormente descrito respecto a la heterogeneidad en el cáncer de próstata, decidimos realizar un estudio para determinar como la expresión de las proteínas MAPK, ERK, p38 y JNK y las fosfatasa MKP-1 y MKP-3 en muestras de pacientes en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Seleccionamos un número representativo de pacientes, cuyos resultados del análisis pudiesen reflejar de alguna manera y ser extrapolados a la población general. Seleccionamos 100 casos entre los años 1995-1997 con la intención de poder ver la evolución en un periodo de seguimiento razonable. De estos casos tuvimos que descartar 5 porque estaban incompletos para el estudio histológico.

Después de revisar entre dos patólogos, los cortes de hematoxilina eosina de todas las piezas y estudiar todas las variables morfológicas, nos centramos en determinar grado de Gleason, centrándonos en la búsqueda de un tercer patrón de alto grado 4 o 5, en los cánceres de próstata, llegamos a la conclusión que la presencia de un tercer patrón de alto grado aunque sea inferior al 5%, hace que estos tumores se comporten peor que el que les corresponde para el grado de Gleason que se les ha asignado basados en un patrón primario y secundario⁵⁶. Por ejemplo: Adenocarcinoma

de próstata Gleason 7 (3+4) con tercer patrón 5 en pieza de prostatectomía (patrón dominante 3, patrón secundario 4, tercer patrón 5). Este tumor se va a comportar como un adenocarcinoma Gleason 7 (4+3) que suelen tener un comportamiento más agresivo.

Además del patrón de Gleason, estudiamos el estado de los márgenes quirúrgicos, la extensión extraprostática y la invasión de las vesículas seminales, todos ellos factores pronósticos de la supervivencia libre de enfermedad. También determinamos la presencia neoplasia intraepitelial de alto grado, que es bien conocida como una lesión pre-maligna del carcinoma invasor y que con frecuencia encontramos en nuestras piezas, así como el carcinoma intraductal más frecuentemente observado en tumores de alto grado histológico. También identificamos de invasiones linfo-vasculares y la invasión capsular, así como la presencia de implantes metastásicos en los ganglios de las piezas de linfadenectomía reglada.

Paralelamente a la valoración morfológica de los casos se fue recaudando información de las antiguas historias clínicas de los pacientes en el departamento de archivo del hospital. Al tratarse de historias clínicas tan antiguas en papel, encontrar la información que necesitábamos para cumplimentar la base de datos que habíamos elaborado previamente fue realmente complicado.

Posteriormente procedimos a seleccionar diferentes zonas tumorales que marcamos con un rotulador para realizar cortes de micro-disección de tejido, como ya explicamos previamente en el apartado de material y métodos. Esta era la forma más eficaz, sencilla y también económica, de poder estudiar muchos tumores con grados de diferenciación distintos.

Seleccionamos tejido tumoral representativo de los diferentes patrones dominante y secundario, y terciario, si lo hubiese y que previamente habíamos determinado en la pieza, áreas de neoplasia intraepitelial prostática de alto y algunas zonas aunque escasas de carcinoma intraductal. Como control interno también seleccionamos tejido sano y glándulas hiperplasias, que aunque sea una lesión benigna muestran un ligero aumento de la proliferación celular comparada con células normales.

La micro-disección de tejido (TMA) de todas las zonas de tejido marcado fue realizada en empresa TriStar Technology Group, LLC. Se confeccionaron 3 bloques de parafina (TA1777, TA1778 y TA1779) con un total 555 cortes de 1 mm de diámetro de muestras de tejido.

Los anticuerpos utilizados fueron MKP-1 (M-18) un anticuerpo policlonal de conejo IgG, específico para el epítipo está localizado en el C-terminus de MKP-1 (péptido de bloqueo sc-1102 P) de Santa Cruz Biotechnology; MKP-3 (F-12) un anticuerpo monoclonal de ratón IgG1, kappa cadena ligera, específico para el epítipo localizado entre los amino ácidos 353-381 en el C-terminus de MKP-3 (péptido de bloqueo, sc-377070 P) de Santa Cruz Biotechnology; anti-active-JNK pAb, (pTPpY) un anticuerpo monoclonal de suero de ratón, de Promega. Su afinidad se debe a que posee dos péptidos fosforilados que corresponden a la forma activa de la enzima JNK; Pho-P44/42MAPK (THR202/TYR204) D13.14.4E 1674370S y Pho-P38 MAPK (THR180/TYR182)(D3F9) 1674511S estos dos últimos de Izasa.

Una vez realizadas las técnicas inmunohistoquímicas procedimos a analizar los cortes histológicos de hematoxilina eosina confirmando la presencia de tumor en la gran mayoría de ellos, así como tejido sano, glándulas hiperplásicas y neoplasia intraepitelial.

Valoramos entonces las inmunohistoquímicas sin saber a qué paciente correspondían ni la relación que guardaban entre si cada uno de los cortes, para no condicionar la interpretación de los resultados. Todos estos datos se fueron anotando inicialmente en papel, en una tabla con el mapa que nos habían facilitado la empresa encargada de la realización de los TMA para cada uno de los bloques de parafina, posteriormente toda esta información se exporto a una tabla de Excel para incorporarla a los datos clínicos y las variables morfológicas que previamente habíamos valorado en la pieza quirúrgica.

La valoración de cada uno de los marcadores fue contrastada entre dos patólogos. Valorando según cada anticuerpo y la tinción esperada, ya sea nuclear y/o citoplásmica para verificar la validez de la prueba.

pERK es una quinasa nuclear y citoplasmática, por lo que la tinción fue valorada en ambas. Determinando el grado de intensidad de la tinción y el porcentaje de células que la expresaban.

pp38 y pJNK son quinasas nucleares, por lo que la tinción fue valorada en el núcleo. Determinando el grado de intensidad de la tinción y el porcentaje de células que la expresaban.

MKP-3 es una fosfatasa citoplasmática, por lo que la tinción fue valorada en el citoplasma. Determinando el grado de intensidad de la tinción y el porcentaje de células que la expresaban. Al valorar todas las tinciones MKP-3 se expresaba en el citoplasma como esperábamos, con diferentes intensidades pero con tendencia general a una baja intensidad en prácticamente todas las muestras, y algunas de ellas no la expresaban.

MKP-1 se expresaba de manera constante en el citoplasma de las células tumorales de manera homogénea con diferentes intensidades, sin tinción nuclear. En las células de PIN se ven gránulos toscos citoplásmicos y paranucleares, y en menor cantidad en células del epitelio normal. MKP-1 es una quinasa nuclear. En ninguno de nuestros casos se tiñeron los núcleos. Este anticuerpo MKP-1 (M18) esta testado y recomendado para ser utilizado en muestras de tejido parafinado. Este patrón de tinción citoplasmática sin expresión nuclear no está descrito en la literatura hasta el momento, por lo que consideramos que este hallazgo debe ser analizado e intentar determinar si se trata de un falso positivo.

Para todos los marcadores se estableció un criterio de intensidad de tinción que variaba entre débil (+), moderada (++) o intensa (+++). También se estimó el porcentaje aproximado de células positivas, pudiendo en un mismo corte identificar diferentes intensidades para las que había que calcular diferentes porcentajes utilizando la fórmula de Histo-score. Se realizó el cálculo total utilizando esta fórmula cuyo valor final oscila entre 0-300.

$$H\text{-score} = (\text{expresión baja } \%) \times 1 + (\text{expresión intermedia } \%) \times 2 + (\text{expresión fuerte } \%) \times 3$$

Una vez obtenidos los resultados de la valoración de nuestros anticuerpos junto a los datos clínicos de los pacientes anonimizados y las variables morfológicas que habíamos analizado previamente y exportado en una tabla Excel procedimos a realizar el análisis con el programa estadístico SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

Como mencionamos anteriormente en el apartado de materiales y métodos se analizaron análisis descriptivos de variables cualitativas y cuantitativas, para obtener la medias de los valores de edad, seguimiento y PSA postquirúrgico que determinaba la recidiva bioquímica.

El análisis bivariable fue el más utilizado para comparar la asociación entre la expresión de los marcadores (MKP-3, ERK, p38, JNK) que estábamos utilizando y las diferentes variables morfológicas: grupos de Gleason, afectación de vesículas seminales, extensión extraprostática, afectación de márgenes quirúrgicos, invasión linfo-vascular, presencia de PIN y carcinoma intraductal y la variable bioquímica de elevación de PSA postquirúrgico (recaída bioquímica).

La supervivencia global (OS) se definió como el tiempo desde el diagnóstico del tumor a la fecha de fallecimiento por cualquier causa o pérdida de seguimiento. En nuestra serie fallecieron 4 pacientes relacionados directamente al cáncer de próstata hasta el año 2012.

La supervivencia libre de enfermedad (DFS) se definió como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico del tumor hasta el primer evento acontecido, considerándose como eventos posibles: recaídas de la enfermedad en cualquier localización, muerte o pérdida de seguimiento. En nuestra serie 47 pacientes tuvieron recaída de la enfermedad o recidiva bioquímica y 11 pacientes desarrollaron metástasis. Como mencione en el párrafo anterior 4 pacientes fallecieron por causas directamente relacionadas a su enfermedad.

Las primeras gráficas de comparaciones de supervivencia de Kaplan-Meier las realizamos para determinar si la asignación del grado de Gleason se correspondía con los valores de la bioquímica y la evolución clínica de los pacientes. Posteriormente la utilizamos para comparar varios de los resultados de nuestros marcadores y correlacionarlos con la recaída bioquímica y el periodo libre de enfermedad.

Para el análisis de estas variables de recaída bioquímica y cálculo de supervivencia se excluyeron 7 pacientes por falta de seguimiento. Si bien para el estudio morfológico contábamos con el material completo de las 95 piezas de prostatectomía radical.

En todos los casos se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

Los resultados de nuestro estudio procedente de una serie retrospectiva de pacientes con cáncer de próstata confirman y sustentan los hallazgos previos descritos en la literatura, sobre la relevancia de la expresión de las proteínas MAPK en tumores malignos de próstata.

Anteriormente hemos comentado los múltiples estudios que demuestran como la desregulación de las distintas MAPK han sido implicadas en desarrollo del cáncer en distintos órganos, incluido la próstata.

En el presente estudio determinamos la expresión de la fosfatasa MKP-3 y sus sustrato, ERK, y la implicación de otras quinasas pro-apoptóticas MAPK p38 y JNK, en el que seleccionamos fundamentalmente muestras de adenocarcinoma de próstata, también tejido prostático normal, con hiperplasia prostática benigna y neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN), obteniendo resultados que orientan a la conclusión de que la disminución de la expresión de MKP-3 es un evento inicial en la transformación maligna de la neoplasia intraepitelial prostática a carcinoma de próstata invasor.

Los resultados sugieren que la disminución o pérdida de la expresión inmunohistoquímica de MKP-3 se correlaciona con un mayor grado histológico del tumor y con periodo de recidiva bioquímica más corto, y por lo tanto puede ser un marcador pronóstico de la enfermedad.

Por otra parte también pudimos determinar alteraciones en la regulación de las distintas MAPK, p38, JNK y ERK con niveles de expresión con tendencia a disminuir a medida que aumentaba el grado histológico del tumor.

Diversos estudios han señalado que la desregulación de la vía de las MKPs actúan como una oncoproteínas, en la tumorigénesis de múltiples líneas celulares de cáncer y también pueden desempeñar un papel en la quimioresistencia. Gracias a años de investigación de diferentes grupos, cada vez conocemos mejor las funciones fisiológicas que desempeñan estas proteínas, y su papel en el desarrollo de enfermedades y diversos tipos de cáncer. Como hemos expresado anteriormente las fosfatasas dual específicas MAPK están ampliamente distribuidas por todos los tejidos en mamíferos, y aunque aún no conocemos con certeza todas sus funciones, sabemos que pueden ser activadas por diferentes estímulos como los rayos ultravioletas, estrés oxidativo, factores de crecimiento, hormonas e hipoxia ⁹².

El papel más destacado de las MKP radica en sus funciones fisiológicas, si bien esto depende absolutamente de un adecuado equilibrio con sus sustratos MAPK. MKP-1 tiene una función relevante en la inflamación mediada por TNF en respuesta a glucocorticoides y también interviene en la homeostasis metabólica ¹⁶⁷. Actualmente sabemos que algunas de estas MKP son imprescindibles para la vida, como es el caso de MKP-3, la cual desempeña un papel crucial en la embriogénesis ¹⁷⁸. MKP-2 es un regulador positivo de la respuesta inflamatoria y MKP-5 es determinante en la mediación de la respuesta inmune innata y adaptativa, principalmente regulando la vía de JNK ⁹⁶.

A MKP-5 se le ha atribuido un papel protector en el cáncer de próstata ²⁰⁴, ya que la sobre-expresión parece reducir la capacidad invasiva de las células del cáncer de próstata aumentando la fosforilación de p38 e induciendo apoptosis, así como propiedades anti-inflamatorias por disminución de la producción de IL-6 en las células del epitelio prostático ¹⁹⁸. Sin embargo una publicación más reciente describe resultados totalmente opuestos, en los que relaciona la sobre-expresión de MKP-5 a funciones de adhesión y motilidad, relacionándolo con el desarrollo de metástasis tumorales ²⁰⁵.

Debido a la implicación de estas proteínas en funciones relevantes para la supervivencia celular no es sorprendente que estén relacionadas con la carcinogénesis.

MKP-1 desempeña un papel en la proliferación celular, diferenciación, transformación, y apoptosis, mayormente a través de la regulación de la señalización de JNK y p38⁹⁴, con poca actividad sobre ERK^{108,206}.

La sobre-expresión de MKP-1 está ampliamente descrita en el cáncer de próstata. El patrón de sobre-expresión de esta proteína parece guardar relación con estadios iniciales de la enfermedad, siendo esta alta en la neoplasia intraepitelial de alto grado y también en la hiperplasia prostática benigna, así como en tumores bien diferenciados (Gleason 6), con una posterior disminución de la expresión a medida que aumenta el grado histológico y diferenciación del tumor, hasta estar ausente en tumores de alto grado y metástasis^{108,206}.

En referencia a las MAPKs sobre las que MKP-1 actúa, se ha descrito una relación inversa entre MKP-1 y JNK en la neoplasia intraepitelial prostática (PIN), pero no con ERK, cuya actividad parece estar aumentada a pesar de la sobre-expresión de MKP-1 en estadios iniciales del cáncer de próstata¹⁰⁸. Esta a su vez parece promover el aumento de la actividad de la vía de MKP-1, favoreciendo en consecuencia la desfosforilación de p38 y JNK, con una consecuente disminución de la apoptosis. Cabría esperar que el identificar una baja expresión de MKP-1 en células de PIN, favorecería la sobre-expresión de quinasas pro-apoptóticas como p38 y JNK, lo cual debería interpretarse como un factor protector contra el desarrollo tumoral, que en este contexto estarían desempeñando un papel supresor tumoral²⁰⁶.

Para entender la implicación de la vía de la MAPK quinasa, ERK en la carcinogénesis del cáncer de próstata, es imprescindible comprender que tanto estímulos como alteraciones en la vía de señalización, son capaces de inducir un aumento de la actividad en cualquiera de los componentes de la vía, si bien esto no siempre implica un aumento de la activación de ERK.

Estímulos como factores de crecimiento como TGF- β y EGF pueden inducir progresión tumoral a través de la vía de ERK en cáncer de próstata, y se ha asociado a mal pronóstico y quimioresistencia²⁰⁷. Alteraciones en los componentes de la vía de señalización, como la sobre-expresión de la vía de Raf se ha asociado a cáncer de próstata en estadios avanzados, a metástasis y mal pronóstico.²⁰⁸

Los resultados de las publicaciones de los estudios de la vía de ERK en cáncer de próstata a veces son contradictorios, esto quizás dependa de la variabilidad genética de los tejidos ratones vs humanos, donde se realizan los experimentos. Estudios sugieren un aumento de la expresión de ERK en la neoplasia intraepitelial prostática y el inicio del desarrollo del cáncer¹⁰⁰, con una posterior disminución de la actividad de ERK que guarda relación con el grado de Gleason y la enfermedad avanzada¹⁰⁹ o inactivación con la adquisición de un fenotipo pobremente diferenciado en las metástasis e independencia androgénica¹⁰⁰. En cambio otras publicaciones estudios con ratones han observado aumento progresivo de ERK desde la hiperplasia prostática benigna hasta el carcinoma infiltrante, asociando niveles elevados de ERK en tumores recurrentes después de la ablación androgénica, lo que sugiere que un aumento en la

señal de ERK pueda estar implicado en la progresión del cáncer de próstata que evoluciona al estado de independencia androgénica.

En relación a p38 sabemos que según el tipo de estímulo puede desempeñar un papel como promotor o supresor tumoral, promoviendo la transformación oncogénica o favoreciendo la apoptosis. p38 está presente en las células epiteliales y basales normales de la próstata. Se ha podido demostrar que p38 está sobre-expresada en las glándulas hiperplásicas y en las células de la neoplasia intraepitelial prostática (PIN), así como el cáncer de próstata Gleason 6, con una posterior tendencia a pérdida de la expresión en adenocarcinomas avanzados y metástasis ^{92,145}. Se ha sugerido que un ratio aumentado de ERK fosforilado:p38 fosforilado (pERK:pp38), favorece el crecimiento tumoral, en cambio, un ratio disminuido ERK fosforilado:p38 fosforilado (pERK:pp38), produce un arresto del crecimiento tumoral ²⁰⁹.

Respecto a JNK se ha demostrado que puede tener funciones opuestas dependiendo del estímulo celular y la isoforma. Publicaciones han asociado alteraciones crónicas en la actividad de JNK con el cáncer de próstata. La sobre-expresión de JNK se ha determinado en tumores órgano confinado, si bien parece estar muy reducida o ausente en tumores localmente avanzados y en las metástasis de cáncer de próstata ^{127,128}.

En los estadios iniciales del cáncer de próstata cuando los tumores son tratados con ablación androgénica se produce una disminución significativa del tamaño del tumor por un incremento significativo de la apoptosis y disminución de proliferación celular. Sin embargo estos pacientes evolucionan al estado de independencia androgénica por razones que aún desconocemos.

Por otra parte los andrógenos son importantes para el desarrollo y adecuado funcionamiento de la próstata y parecen tener un papel fundamental en la carcinogénesis. La terapia de ablación androgénica, una terapia ampliamente utilizada en cáncer de próstata avanzado, induce apoptosis por activación de la vía de JNK y disminuyendo la proliferación celular ¹³¹.

Muchos pacientes con enfermedad avanzada la única opción terapéutica es la terapia de ablación androgénica, la cual actúa evitando la activación de los genes reguladores de andrógenos, reduciendo de esta manera los niveles de estimulación de los receptores de andrógenos (AR). Esta terapia fue desarrollada por Huggins y Hodges y no ha cambiado en 60 años. Es tan eficaz que puede reducir el volumen tumoral en un 70-80% de su volumen original. Sin embargo se sabe que gran parte de los pacientes van a recaer, para los que hay pocas opciones terapéuticas y es particularmente esta condición lo que más contribuye a la morbi-mortalidad asociada a este cáncer ²¹⁰.

Desafortunadamente con el tiempo el cáncer de próstata se vuelve resistente a la apoptosis a pesar de la terapia de ablación androgénica y progresa a un estado independencia androgénica. El carcinoma de próstata con independencia androgénica (CaPAI) continúan dependiendo de las señales de receptores andrógenos, que son activados por niveles circulantes muy bajos de andrógeno ²¹¹. Esta hipersensibilización de los RA a bajos niveles de andrógenos, incluyen mutaciones de receptores de andrógenos que permiten la activación con niveles muy bajos de andrógenos o de

esteroides, mayor estabilidad de los RA, sobre-expresión de RA y aumento en la señalización de la vía tirosina quinasa ²¹¹.

Las MAPK parecen desempeñar un papel importante hacia el estado de independencia androgénica (AI). Estudios han determinado un aumento en la expresión de ERK en tumores recurrentes posterior al tratamiento de ablación androgénica, lo que podría sugerir que ERK esté relacionada con la evolución a la independencia androgénica ²⁰⁶. Un aumento de los andrógenos produce una disminución de la fosforilación de quinasas pro-apoptóticas y en consecuencia de la apoptosis.

La activación de JNK depende de los receptores de andrógenos. Los andrógenos inhiben la apoptosis mediante disminución de la fosforilación de JNK. Un estudio ha determinado que c-Fos y c-Jun, dianas de JNK, están aumentados en tumores avanzados con independencia androgénica y se asocian a activación del ERK, sin embargo en esta situación la actividad de JNK esta disminuida, lo que indica que c-Jun podría estar activado por otra vía ²¹².

El estado de independencia androgénica también se ha asociado a una actividad aumentada de la vía de Raf por disminución significativa de sus inhibidores en estadios avanzados de cáncer de próstata ²⁰². Se ha determinado que una elevación conjunta de Raf-1, MEK y ERK1/2 fosforilado, es indicativo de que la activación podría estar desencadenada por IL-6, a través de la vía de ERK, que resulta en un aumento de la actividad de ERK. Se ha propuesto un papel favorecedor de la IL-6 en el aumento de la expresión y actividad de receptores de andrógenos (RA), promoviendo de esta forma el crecimiento tumoral con independiente androgénica, que podría depender de la actividad de p38 ¹⁴⁹.

Si bien el papel de la vía Raf/MEK/ERK en cáncer de próstata aún sigue siendo controversial. Se sabe que un aumento de la expresión está asociado a enfermedad avanzada, independencia hormonal y mal pronóstico. Pero los mecanismos de como ocurre esto aún no están bien establecidos, ya que no se han determinado mutaciones de Ras, Raf, MEK o ERK. Pero si se han determinado algunas amplificaciones de Ras.

A pesar de que p38 tiene un importante papel pro-apoptótico, quizás también contribuya a la progresión del cáncer de próstata, promoviendo el crecimiento tumoral, la independencia androgénica y el desarrollo de metástasis ²¹⁴. Otras cualidades atribuibles a p38 son el aumento de la supervivencia celular, clonogenicidad e invasividad en células de cáncer de próstata, proporcionando un soporte para la adquisición de un estado de independencia androgénica ¹⁴⁸.

En base a lo anteriormente descrito exponemos los resultados obtenidos en nuestro estudio:

En la neoplasia intraepitelial prostática la gran mayoría de los casos mostraba alta expresión de MKP-3 y esto se asociaba a baja expresión de ERK, pero no con p38 y JNK

En nuestra serie también incluimos muestras de neoplasia intraepitelial prostática para poder observar el epitelio prostático en todas sus fases evolutivas hacia la transformación maligna. En todas las muestras de neoplasia intraepitelial prostática

(PIN) se observó tinción con MKP-3, con un claro predominio de la alta expresión en estas lesiones y esto a su vez se asociaban a una baja expresión de la forma fosforilada de ERK.

ERK es diana específica de MKP-3 y se ha relacionado fundamentalmente con el desarrollo y crecimiento tumoral, el hallazgo de predominio de una baja expresión de p ERK es concordante con lo esperado en relación a la expresión de MKP-3 en nuestras muestras de PIN de alto grado. Como hemos mencionado anteriormente, la sobre-expresión en lesiones estas pre-neoplásicas parece guardar relación con un papel protector contra la evolución a la transformación invasiva, por lo que es razonable y comprendiendo la vía de funcionamiento de ERK, un aumento de la actividad de la vía de MKP-3 conlleva una disminución de la forma fosforilada de ERK disminuyendo de esta manera el proliferación tumoral.

Respecto a pJNK y pp38 tenían una mayor tendencia a mostrar baja expresión. Para pJNK 49 casos (84,5%) tenían baja expresión y con pp38 49 casos (61,3%). Se identificaron 30 de casos con sobre-expresión (15,5%) para pJNK y 31 (38%) para pp38.

Como sabemos JNK y p38 tienen un papel importante en la mediación de la apoptosis inducida por estrés, y son dianas específicas de MKP-1, pero también de MKP-3. También sabemos que a veces dependiendo del estímulo pueden tener funciones contradictorias. El estado de neoplasia intraepitelial, es un estado pre-neoplásico, bien conocido y establecido. La mayoría de estas lesiones de PIN que hemos estudiado han sido tomadas de piezas de prostatectomía de pacientes con carcinomas ya desarrollados con años de evolución, en los que es probable que estas lesiones de neoplasia intraepitelial prostática de alto se comporten de manera más parecida a un carcinoma invasor bien diferenciado. Viéndolo de esta manera es menos difícil entender porque pJNK y pp38 no están sobre-expresados, pero aún siguen conservando una baja expresión.

La expresión de MKP-3 disminuye de forma progresiva, en una proporción elevada de carcinomas de próstata en todas las categorías de Gleason, y tiene una asociación estadísticamente significativa con un periodo de recaída bioquímica y un periodo libre de enfermedad más corto, por lo que constituye un marcador pronóstico de la enfermedad.

En nuestra serie la gran mayoría de los casos mostraban una baja expresión de MKP-3 que se encontraba distribuidos en todas las categorías de Gleason con predominio de la más baja expresión en el grupo 4 (Gleason 8), seguido del grupo 3 Gleason 7 (4+3).

La disminución de la expresión de MKP-3 se observó en tumores Gleason 6, con una pérdida progresiva de la intensidad de la tinción a medida que aumentaba el grado histológico. Se observaron algunos cortes que no tenían expresión de MKP-3, pero al tratarse de muestras de 1 mm y tener más cortes que eran representativos del mismo nódulo tumoral, interpretamos el caso como baja expresión. No se identificó ningún caso con pérdida absoluta de la expresión de MKP-3.

Hemos podido demostrar que existe una relación estadísticamente significativa entre la disminución progresiva de la expresión de MKP-3 y un tiempo de recidiva bioquímica más corto, y la disminución progresiva de la expresión de MKP-3 y periodo libre de enfermedad más corto.

El patrón de sobre-expresión de MKP-3 era más prevalente en el grupo 1 y 2, correspondientes a las categorías de Gleason 6 y 7 (3+4), con solo 5 casos en el grupo 3 correspondiente de Gleason 7 (4+3) y 1 en el grupo 4 Gleason 8 o mayor.

Nuestros hallazgos son concordantes con lo publicado en la literatura. La disminución de la expresión de las distintas fosfatasa, y en relación a MKP-3 en cáncer de próstata parece estar sobre-expresada en estadios iniciales de cáncer de próstata, seguido de pérdida de expresión a medida que el grado histológico aumenta, así como en las metástasis¹¹⁰. Nosotros hemos observado una baja expresión de MKP-3 en tumores infiltrantes que varían desde ligeramente más intensa en tumores mejor diferenciados con pérdida progresiva de la expresión a medida que el grado de Gleason aumenta.

MKP-3 estaba sobre-expresada en tumores de próstata bien y moderadamente diferenciados en estadios iniciales de la enfermedad

De los 36 pacientes de con adenocarcinoma Gleason 6, 24 pacientes mostraban sobre-expresión de MKP-3. En este grupo de Gleason 6, de los que mostraban alta expresión solo tuvieron recidiva bioquímica 7 pacientes. Ninguno desarrollo metástasis y uno falleció en el post-operatorio. En las piezas 4 tuvieron invasión de vesículas seminales, 6 presentaban extensión extraprostática, 13 con afectación de los márgenes quirúrgicos, y 19 invasiones linfáticas. Si bien la evolución clínica de los pacientes a pesar de los hallazgos en la pieza con la invasión de vesículas seminales, extensión extraprostática y afectación de los márgenes, todas ellas variables morfológicas que confieren en sí mismas un peor pronóstico del cáncer, aunque se trate de un tumor bien diferenciado.

El papel que desempeña la sobre-expresión de MKP-3 en estadios iniciales del cáncer puede guardar relación con su función fisiológica anti-apoptótica demostrada en estudios relacionados con la embriogénesis debido a su papel regulador de la actividad de ERK¹⁷⁹. Estudios en cáncer de páncreas han demostrado un aumento de la regulación de MKP-3 en la neoplasia intraepitelial comparada con el tejido normal, con una pérdida absoluta de la expresión cuando el tumor evoluciona a su estado invasivo¹⁹⁷. Por lo cual la sobre-expresión de MKP-3 en estadios iniciales parece le otorga un papel protector contra la progresión tumoral por inhibición de la fosforilación de ERK que se correlaciona con una actividad aumentada de la forma fosforilada de JNK. Esta disminución en la regulación puede asociarse a mutaciones de K-Ras que están presentes en múltiples cánceres y de esta manera contribuir al aumento de la señalización a través de la vía de ERK, promoviendo entonces el crecimiento tumoral. Por otra parte la regulación de la vía de MKP-3 puede estar aumentada en otros tipos de cáncer que se acompañen de mutaciones de la vía de Ras²¹⁵

Según lo descrito en la literatura, existen resultados a veces contradictorios respecto al patrón de expresión de estas MKP, que deben ser interpretadas con cautela,

ya que según los distintos tipos morfológicos de tumor, su significado clínico es absolutamente opuesto.

En nuestra serie incluimos muestras representativas de PIN, tejido normal e hiperplasia como control interno. Observamos un patrón de sobre-expresión en la neoplasia intraepitelial prostática, con una disminución significativa de la expresión en el carcinoma invasor.

En nuestras muestras el patrón de expresión y comportamiento de las MKP-3 encaja más con el patrón de expresión descrito en las neoplasias de páncreas, con un sobre-expresión en estadios iniciales de la enfermedad como en la neoplasia intraepitelial prostática para después disminuir o perderse.

La expresión de pERK se correlaciona con un comportamiento biológico desfavorable independiente de la expresión de las formas fosforiladas de JNK-p38.

En nuestra serie determinamos subgrupos de expresión de pERK comparados con la expresión de las MAPK pro-apoptóticas JNK y p38. Había una alta prevalencia de casos que no tenían expresión de pERK. Dentro del grupo de casos sin expresión de pERK estaban los que expresaban JNKp38+ y los que no JNKp38-. Ambos grupos independientemente de la expresión de JNKp38 tenían un mejor comportamiento clínico que aquellos casos pERK+.

Los casos pERK+ con independencia de la expresión de JNKp38 tienen una evolución clínica significativamente mucho peor que cuando pERK está ausente. Esto es de gran relevancia debido a la función proliferativa de pERK, que visto de esta manera en los casos aun con expresión de pJNK pp38, parece imponer su función favorecedora de la carcinogénesis sobre la supresora tumoral de pJNKpp38.

Un quinto subgrupo los pERK- /JNKpp38- (“triple negativo”) tenían un comportamiento clínico significativamente mejor comparado con el resto de los cuatro subgrupos. No sabemos con claridad a que se debe esto, pero puede ser que se deban a alteraciones por otra vía diferente a MAPKs.

Datos publicados asocian la desregulación de la vía de pERK en aproximadamente el 30% de los tumores en humanos. En nuestra serie hemos podido observar una disminución de la expresión y en algunos casos pérdida de la expresión de pERK en las glándulas neoplásicas. Como dato añadido también observamos la sobre-expresión de pERK en muestras con neoplasia intraepitelial prostática (PIN). La sobre-expresión en neoplasia in situ están en consonancia con lo que hay descrito en las publicaciones previas, en los que se describe un aumento progresivo de pERK desde la hiperplasia prostática benigna hasta el carcinoma de próstata invasor, sin bien gran parte de nuestros carcinomas no lo expresaban, la gran mayoría de los casos que mostraban expresión de pERK guardaban relación con el grado de Gleason y el estadio tumoral, lo cual hemos podido corroborar. Estudios sugieren una disminución de la expresión de pERK en tumores avanzados, mientras que otros relacionan con la evolución al estado de independencia androgénica¹⁰⁹.

Como ya hemos mencionado anteriormente pJNK a se le han atribuido funciones opuestas dependiendo del estímulo celular y la isoforma. En nuestra serie la

gran mayoría de los casos mostraban baja expresión de pJNK (62,4%), pero también había grupo que mostraba sobre-expresión (37,6%).

Numerosas publicaciones han asociado alteraciones crónicas en la actividad de JNK con el cáncer de próstata. La sobre-expresión de pJNK se ha esta descrita en tumores órgano confinado, si bien parece estar muy reducida o ausente en tumores localmente avanzados y en las metástasis de cáncer de próstata, lo cual es concordante con nuestros hallazgos¹²⁸.

En relación a pp38 se ha descrito papeles contradictorios como promotor o supresor tumoral dependiendo del estímulo. En cáncer de próstata la sobre-expresión con aumento progresivo desde la hiperplasia hasta la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y el adenocarcinoma de próstata Gleason 6 está bien establecida. En nuestra serie pp38 se expresaba en un gran número de muestras de PIN y carcinomas bien diferenciados, observado incluso sobre-expresión en bastantes de ellos, pero con una clara tendencia a la disminución de la expresión en adenocarcinomas avanzados.

En los tumores de próstata Gleason 8 existe un claro predominio de la baja expresión de MKP-3

En nuestra serie de pacientes con cáncer de próstata la gran mayoría tenía un patrón de baja expresión de MKP-3, con excepción de 1 caso que mostraba sobre-expresión.

Como es de esperarse estos tumores de alto grado en consecuencia tienen un comportamiento biológico más agresivo. De los 21 pacientes, 15 desarrollaron recidiva bioquímica de la enfermedad, 6 pacientes tuvieron metástasis óseas y 4 fallecieron a causa de la enfermedad. Respecto a las variables morfológicas en la pieza de PR, 9 presentaron invasión de las vesículas seminales, 15 tenían extensión extraprostática, 12 mostraban afectación de los márgenes quirúrgicos y 19 con invasiones linfáticas.

La correlación entre la baja expresión de MKP-3 en cáncer de próstata, mal pronóstico y quimioresistencia, ha sido demostrada en múltiples estudios. A diferencia de la próstata la sobre-expresión de MKP-3 en otros tumores como ovario y mama, se han asociado a mala pronóstico y quimioresistencia.

La pérdida absoluta de expresión de MKP-3 se ha relacionado con progresión de la enfermedad y parece favorecer a la evolución de un estado de independencia andrógena.

La baja expresión de MKP-3 en cáncer de próstata es un factor de mal pronóstico y se correlaciona con progresión a un fenotipo andrógeno independiente

Como hemos podido comprobar la gran mayoría de los pacientes con cáncer de próstata que habían recibido tratamiento de ablación androgénica con posterior recaída de la enfermedad, mostraban en su mayoría una baja expresión de MKP-3. Las formas fosforiladas de las quinasas p38 y ERK tenían predominio de la baja expresión, si bien en nuestros casos JNK estaba distribuido de manera casi proporcional en ambos grupos de expresión.

La gran mayoría de los cánceres de próstata dependen de los andrógenos para crecer y sobrevivir, es por ello que la terapia de ablación androgénica es un tratamiento de elección, que inicialmente produce regresión tumoral mediada por apoptosis. Si bien con el tiempo los receptores de andrógenos residuales se vuelven hipersensibles y responden a cualquier estímulo por muy bajo que sea.

La participación de Raf-1 en la activación de vía de MAPK/ERK induce proliferación y favorece la tumorigénesis. Si bien estudios en carcinoma de próstata se ha determinado que en una proporción de casos no se ha encontrado una asociación clara entre la actividad de Raf y la actividad de MAPK/ERK, lo que parece indicar que las dos vías podrían estar activas y funcionar de forma independiente en estadios avanzados del cáncer de próstata, permitiendo el crecimiento del tumor sin necesidad del estímulo hormonal que induzca proliferación y metástasis ²¹⁶.

Se cree que la activación de los receptores de andrógenos inducida por c-Jun a través de la vía de MAPK/ERK sea un probable mecanismo de activación de los genes activadores de andrógenos, sin la necesidad de señales de estimulación por andrógenos, volviendo el tumor insensible a la ablación androgénica ²¹⁷.

Estudios sustentan la pérdida de expresión de MKP-3 como un factor determinante hacia la progresión de un estado de independencia hormonal.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio de tesis Doctoral, llegamos a las siguientes conclusiones:

1.- La sobre-expresión de las fosfatasa MKP-3 en las lesiones de neoplasia intraepitelial prostática y carcinomas de próstata Gleason 6 constituyen un evento inicial en la carcinogénesis del cáncer de próstata, y parece le confiere un papel protector en la supervivencia libre de enfermedad en tumores bien diferenciados.

2.- La disminución de la expresión de MKP-3 en carcinoma de próstata es un factor pronóstico determinante, relacionado directamente con un periodo de recidiva bioquímica y una supervivencia libre de enfermedad más corta a medida que aumenta el grado histológico del tumor.

3.- La disminución o pérdida de expresión de la forma fosforilada de p38, relacionada fundamentalmente con funciones supresoras tumorales mediadas por apoptosis, se correlaciona con un periodo libre de enfermedad más corto en pacientes con cáncer de próstata.

4.- Existe una correlación entre la expresión de pERK y pJNK/pp38, con un peor pronóstico para los tumores que muestran predominio de la expresión de ERK.

5.- La disminución de la expresión de MKP-3 está asociada a un fenotipo de carcinoma de próstata andrógeno independiente y se asociada a baja expresión de pERK, lo que indica que una vía alternativa diferente a MAPK, puede estar estimulando los receptores de andrógenos favoreciendo de esta manera la progresión y crecimiento tumoral.

6.- El papel que desempeña MKP-3 en el cáncer la convierte objetivo de estudio extremadamente interesante con vistas a considerarla como una posible diana terapéutica, primordialmente en aquellos pacientes que han progresado a un estado de independencia androgénica, en los que las opciones terapéuticas para ofrecerles, son realmente escasas en el momento actual.

7.- La expresión citoplásmica de MKP-1, en ausencia de expresión nuclear, supone un hallazgo no esperado y de compleja interpretación, por lo que estos resultados deben ser considerados con cautela, ya que en la literatura publicada hasta este momento no existe información en relación a este patrón de expresión en cáncer de próstata. Por esto consideramos que este patrón de expresión debe ser estudiado con mayor detenimiento y contrastado para determinar su veracidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M et al. Prostate Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. GLOBOCAM. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Published 2012. Accessed February 12, 2017.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262.
3. Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol*. 1993;150(2 Pt 1):379-385. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8326560>. Accessed February 16, 2017.
4. Jones JS. *Prostate Biopsy : Indications, Techniques, and Complications*. Humana Press; 2008.
5. Breslow N, Chan CW, Dhom G, et al. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *Int J cancer*. 1977;20(5):680-688. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/924691>. Accessed February 12, 2017.
6. Coffey DS. Similarities of prostate and breast cancer: Evolution, diet, and estrogens. *Urology*. 2001;57(4 Suppl 1):31-38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11295592>. Accessed February 12, 2017.
7. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz G, Rimm EB, Willett WC. Relationship of diet to risk of colorectal adenoma in men. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84(2):91-98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1310511>. Accessed February 12, 2017.
8. Knize MG, Salmon CP, Mehta SS, Felton JS. Analysis of cooked muscle meats for heterocyclic aromatic amine carcinogens. *Mutat Res*. 1997;376(1-2):129-134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202748>. Accessed February 12, 2017.
9. Wakabayashi K, Totsuka Y, Fukutome K, Oguri A, Ushiyama H, Sugimura T. Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic beta-carbolines. *Mutat Res*. 1997;376(1-2):253-259. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202762>. Accessed February 12, 2017.
10. Peter T Scardino MD, Bernard H Bochner MD, Michael J Zelefsky MD, W. M Linehan MD, Joel Sheinfeld MD, Nicholas J Vogelzang MD BIRM. *Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology*. <https://shop.lww.com/Comprehensive-Textbook-of-Genitourinary-Oncology/p/9781608313525>. Published 2011. Accessed February 12, 2017.
11. Seethalakshmi L, Bala RS, Malhotra RK, et al. 17 beta-estradiol induced prostatitis in the rat is an autoimmune disease. *J Urol*. 1996;156(5):1838-1842. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8863627>. Accessed February 12, 2017.
12. Stoker TE, Robinette CL, Cooper RL. Perinatal exposure to estrogenic compounds and the subsequent effects on the prostate of the adult rat: evaluation of inflammation in the ventral and lateral lobes. *Reprod Toxicol*. 13(6):463-472. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10613394>. Accessed February 12, 2017.
13. Nelson WG, DeMarzo AM, Yegnasubramanian S. The Diet as a Cause of Human Prostate Cancer. In: *Cancer Treatment and Research*. Vol 159. ; 2014:51-68. doi:10.1007/978-3-642-38007-5_4.
14. Brooks JD, Weinstein M, Lin X, et al. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7(6):531-536. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9641498>. Accessed February 12, 2017.
15. Grubb RL, Pinsky PF, Greenlee RT, et al. Prostate cancer screening in the

- Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian cancer screening trial: update on findings from the initial four rounds of screening in a randomized trial. *BJU Int*. 2008;102(11):1524-1530. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08214.x.
16. Moch, H., Humphrey, P.A., Ulbright, T.M., Reuter VE. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Fourth edition - WHO - OMS -.
<http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4008>. Published 2016. Accessed February 12, 2017.
 17. Mai KT, Isotalo PA, Green J, Perkins DG, Morash C, Collins JP. Incidental prostatic adenocarcinomas and putative premalignant lesions in TURP specimens collected before and after the introduction of prostate-specific antigen screening. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(10):1454-1456. doi:10.1043/0003-9985(2000)124<1454:IPAAPP>2.0.CO;2.
 18. Jones JS, Follis HW, Johnson JR. Probability of finding T1a and T1b (Incidental) prostate cancer during TURP has decreased in the PSA era. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2009;12(1):57-60. doi:10.1038/pcan.2008.14.
 19. Fernández Rosado E, Gómez Veiga F, Alvarez Castelo L, Ruibal Moldes M, Mosquera Reboredo JM, González Martín M. [Prevalence of incidental prostatic adenocarcinoma after suprapubic adenomectomy with or without previous prostatic biopsy]. *Arch Esp Urol*. 59(1):31-42.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16568691>. Accessed February 15, 2017.
 20. McNeal JE, Price HM, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Stage A versus stage B adenocarcinoma of the prostate: morphological comparison and biological significance. *J Urol*. 1988;139(1):61-65.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3336108>. Accessed February 12, 2017.
 21. Epstein JI. Diagnostic criteria of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Hum Pathol*. 1995;26(2):223-229.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7860053>. Accessed February 12, 2017.
 22. Aydin H, Zhou M, Herawi M, Epstein JI. Number and location of nucleoli and presence of apoptotic bodies in diagnostically challenging cases of prostate adenocarcinoma on needle biopsy. *Hum Pathol*. 2005;36(11):1172-1177. doi:10.1016/j.humpath.2005.09.001.
 23. D'Amico A V., Moul J, Carroll PR, Sun L, Lubeck D, Chen M-H. Cancer-Specific Mortality After Surgery or Radiation for Patients With Clinically Localized Prostate Cancer Managed During the Prostate-Specific Antigen Era. *J Clin Oncol*. 2003;21(11):2163-2172. doi:10.1200/JCO.2003.01.075.
 24. Kattan MW, Eastham JA, Stapleton AM, Wheeler TM, Scardino PT. A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(10):766-771.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9605647>. Accessed February 13, 2017.
 25. Kattan MW, Stapleton AM, Wheeler TM, Scardino PT. Evaluation of a nomogram used to predict the pathologic stage of clinically localized prostate carcinoma. *Cancer*. 1997;79(3):528-537.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9028364>. Accessed February 13, 2017.
 26. van der Kwast TH, Amin MB, Billis A, et al. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 2: T2 substaging and prostate cancer volume. *Mod Pathol*. 2011;24(1):16-25. doi:10.1038/modpathol.2010.156.
 27. Jeong BC, Chalfin HJ, Lee SB, et al. The relationship between the extent of extraprostatic extension and survival following radical prostatectomy. *Eur Urol*.

- 2015;67(2):342-346. doi:10.1016/j.eururo.2014.06.015.
28. Savdie R, Horvath LG, Benito RP, et al. High Gleason grade carcinoma at a positive surgical margin predicts biochemical failure after radical prostatectomy and may guide adjuvant radiotherapy. *BJU Int.* 2012;109(12):1794-1800. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10572.x.
29. Cao D, Humphrey PA, Gao F, Tao Y, Kibel AS. Ability of Linear Length of Positive Margin in Radical Prostatectomy Specimens to Predict Biochemical Recurrence. *Urology.* 2011;77(6):1409-1414. doi:10.1016/j.urology.2010.10.059.
30. Ng J, Mahmud A, Bass B, Brundage M. Prognostic significance of lymphovascular invasion in radical prostatectomy specimens. *BJU Int.* 2012;110(10):1507-1514. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11115.x.
31. Epstein JI. Prognostic Significance of Tumor Volume in Radical Prostatectomy and Needle Biopsy Specimens. *J Urol.* 2011;186(3):790-797. doi:10.1016/j.juro.2011.02.2695.
32. Byar DP, Mostofi FK. Carcinoma of the prostate: prognostic evaluation of certain pathologic features in 208 radical prostatectomies. Examined by the step-section technique. *Cancer.* 1972;30(1):5-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5064808>. Accessed February 13, 2017.
33. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature.* 2011;470(7333):214-220. doi:10.1038/nature09744.
34. Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, et al. Integrative Genomic Analyses Reveal an Androgen-Driven Somatic Alteration Landscape in Early-Onset Prostate Cancer. *Cancer Cell.* 2013;23(2):159-170. doi:10.1016/j.ccr.2013.01.002.
35. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet.* 2012;44(6):685-689. doi:10.1038/ng.2279.
36. Cairns P, Okami K, Halachmi S, et al. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res.* 1997;57(22):4997-5000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371490>. Accessed February 13, 2017.
37. Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, et al. Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity. *Eur Urol.* 2013;63(5):920-926. doi:10.1016/j.eururo.2012.08.053.
38. Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature.* 2012;487(7406):239-243. doi:10.1038/nature11125.
39. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell.* 2010;18(1):11-22. doi:10.1016/j.ccr.2010.05.026.
40. Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase / MAP Kinase Phosphatase Regulation : Roles in Cell Growth , Death , and Cancer. *Pharmacol Rev.* 2008;60(3):261-310. doi:10.1124/pr.107.00106.261.
41. Dickinson RJ, Keyse SM. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 22):4607-4615. doi:10.1242/jcs.03266.
42. Wetterauer C, Weibel M, Gsponer JR, et al. Incidental prostate cancer prevalence at radical cystoprostatectomy--importance of the histopathological work-up. *Virchows Arch.* 2014;465(6):629-636. doi:10.1007/s00428-014-1656-9.

43. Guileyardo JM, Johnson WD, Welsh RA, Akazaki K, Correa P. Prevalence of latent prostate carcinoma in two U.S. populations. *J Natl Cancer Inst.* 1980;65(2):311-316. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6931251>. Accessed February 12, 2017.
44. Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA.* 1994;271(5):368-374. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7506797>. Accessed February 12, 2017.
45. Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res.* 1980;40(7):2428-2432. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7388802>. Accessed February 12, 2017.
46. Aus G, Damber J-E, Khatami A, Lilja H, Stranne J, Hugosson J. Individualized screening interval for prostate cancer based on prostate-specific antigen level: results of a prospective, randomized, population-based study. *Arch Intern Med.* 2005;165(16):1857-1861. doi:10.1001/archinte.165.16.1857.
47. Schröder FH, van der Crujisen-Koeter I, de Koning HJ, Vis AN, Hoedemaeker RF, Kranse R. Prostate cancer detection at low prostate specific antigen. *J Urol.* 2000;163(3):806-812. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10687982>. Accessed February 12, 2017.
48. Bratt O, Lilja H. Serum markers in prostate cancer detection. *Curr Opin Urol.* 2015;25(1):59-64. doi:10.1097/MOU.0000000000000128.
49. Torres Zambrano G, Lujan Galán M, Pascual Mateo C, García Tello A, Rodríguez N, Berenguer Sánchez A. [Preliminary data of the Spanish contribution to the European Randomized Study on Screening of Prostate Cancer (ERSPC)]. *Arch Esp Urol.* 2007;60(7):737-743. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17937333>. Accessed February 18, 2017.
50. Schröder FH. Stratifying Risk — The U.S. Preventive Services Task Force and Prostate-Cancer Screening. *N Engl J Med.* 2011;365(21):1953-1955. doi:10.1056/NEJMp1112140.
51. Rosoff JS, Prasad SM, Savage SJ. Ultrasonography in prostate cancer: current roles and potential applications in radiorecurrent disease. *World J Urol.* 2013;31(6):1353-1359. doi:10.1007/s00345-013-1080-9.
52. Dell'Atti L. Role of transrectal ultrasound in the diagnosis of extracapsular prostate cancer. *J Ultrasound.* 2014;17(1):47-51. doi:10.1007/s40477-014-0070-0.
53. Pinto F, Totaro A, Palermo G, et al. Imaging in prostate cancer staging: present role and future perspectives. *Urol Int.* 2012;88(2):125-136. doi:10.1159/000335205.
54. Halpern EJ, Gomella LG, Forsberg F, McCue PA, Trabulsi EJ. Contrast Enhanced Transrectal Ultrasound for the Detection of Prostate Cancer: A Randomized, Double-Blind Trial of Dutasteride Pretreatment. *J Urol.* 2012;188(5):1739-1745. doi:10.1016/j.juro.2012.07.021.
55. Shukla-Dave A, Hricak H. Role of MRI in prostate cancer detection. *NMR Biomed.* 2014;27(1):16-24. doi:10.1002/nbm.2934.
56. Cedeño Díaz OM, Fernández Aceñero MJ, Alvarez Fernández E. Prognostic influence of the third Gleason grade in prostatectomy specimens. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2012;30(4):386-390. doi:10.1016/j.urolonc.2010.05.007.
57. Patel AA, Chen M-H, Renshaw AA, D'Amico A V. PSA failure following definitive treatment of prostate cancer having biopsy Gleason score 7 with tertiary grade 5. *JAMA.* 2007;298(13):1533-1538. doi:10.1001/jama.298.13.1533.

58. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int*. 2013;111(5):753-760. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11611.x.
59. Johns Hopkins Department of Pathology: New Contemporary Prostate Cancer Grading System. <http://pathology.jhu.edu/ProstateCancer/NewGradingSystem.cfm>. Accessed February 24, 2017.
60. Hameed O, Humphrey PA. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology of the prostate. *Semin Diagn Pathol*. 2005;22(1):88-104. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16512601>. Accessed February 12, 2017.
61. Sehdev AES, Pan CC, Epstein JI. Comparative analysis of sampling methods for grossing radical prostatectomy specimens performed for nonpalpable (stage T1c) prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2001;32(5):494-499. doi:10.1053/hupa.2001.24322.
62. Baisden BL, Kahane H, Epstein JI. Perineural invasion, mucinous fibroplasia, and glomerulations: diagnostic features of limited cancer on prostate needle biopsy. *Am J Surg Pathol*. 1999;23(8):918-924. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10435561>. Accessed February 13, 2017.
63. Krušlin B, Tomas D, Rogatsch H, et al. Periacinar retraction clefting in the prostatic needle core biopsies: an important diagnostic criterion or a simple artifact? *Virchows Arch*. 2003;443(4):524-527. doi:10.1007/s00428-003-0862-7.
64. Amin MB, Epstein JI, Ulbright TM, et al. Best Practices Recommendations in the Application of Immunohistochemistry in Urologic Pathology. *Am J Surg Pathol*. August 2014;1. doi:10.1097/PAS.0000000000000254.
65. Brimo F, Epstein JI. Immunohistochemical pitfalls in prostate pathology. *Hum Pathol*. 2012;43(3):313-324. doi:10.1016/j.humpath.2011.11.005.
66. Osunkoya AO, Hansel DE, Sun X, Netto GJ, Epstein JI. Aberrant diffuse expression of p63 in adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy and radical prostatectomy: report of 21 cases. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(3):461-467. doi:10.1097/PAS.0b013e318157020e.
67. Zhou M, Aydin H, Kanane H, Epstein JI. How often does alpha-methylacyl-CoA-racemase contribute to resolving an atypical diagnosis on prostate needle biopsy beyond that provided by basal cell markers? *Am J Surg Pathol*. 2004;28(2):239-243. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15043314>. Accessed February 12, 2017.
68. Magi-Galluzzi C, Luo J, Isaacs WB, Hicks JL, de Marzo AM, Epstein JI. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a variably sensitive immunohistochemical marker for the diagnosis of small prostate cancer foci on needle biopsy. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(8):1128-1133. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12883245>. Accessed February 12, 2017.
69. Zhou M, Jiang Z, Epstein JI. Expression and diagnostic utility of alpha-methylacyl-CoA-racemase (P504S) in foamy gland and pseudohyperplastic prostate cancer. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(6):772-778. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12766580>. Accessed February 12, 2017.
70. Harvey TJ, Hooper JD, Myers SA, Stephenson SA, Ashworth LK, Clements JA. Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *J Biol Chem*. 2000;275(48):37397-37406. doi:10.1074/jbc.M004525200.
71. Darson MF, Pacelli A, Roche P, et al. Human glandular kallikrein 2 expression in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Urology*. 1999;53(5):939-

944. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10223487>. Accessed February 12, 2017.
72. Lintula S, Stenman J, Bjartell A, Nordling S, Stenman U-H. Relative concentrations of hK2/PSA mRNA in benign and malignant prostatic tissue. *Prostate*. 2005;63(4):324-329. doi:10.1002/pros.20194.
73. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL, ISUP Grading Committee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(9):1228-1242. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096414>. Accessed February 12, 2017.
74. Epstein JI. Gleason score 2-4 adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy: a diagnosis that should not be made. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(4):477-478. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10757394>. Accessed February 12, 2017.
75. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2015;40(2):1. doi:10.1097/PAS.0000000000000530.
76. Humphrey PA. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology*. 2012;60(1):59-74. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04039.x.
77. Amin MB, Weinberg RW, LaPlante MM, Marino D, Gast P. *Gleason Grading of Prostate Cancer : A Contemporary Approach*.
78. Bostwick DG, Egbert BM, Fajardo LF. Radiation injury of the normal and neoplastic prostate. *Am J Surg Pathol*. 1982;6(6):541-551. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7149094>. Accessed February 13, 2017.
79. Goldstein NS, Martinez A, Vicini F, Stromberg J. The histology of radiation therapy effect on prostate adenocarcinoma as assessed by needle biopsy after brachytherapy boost. Correlation with biochemical failure. *Am J Clin Pathol*. 1998;110(6):765-775. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9844589>. Accessed February 13, 2017.
80. Pollack A, Cowen D, Troncoso P, et al. Molecular markers of outcome after radiotherapy in patients with prostate carcinoma. *Cancer*. 2003;97(7):1630-1638. doi:10.1002/cncr.11230.
81. Suzue K, Montag AG, Tretiakova M, Yang XJ, Sahoo S. Altered expression of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in prostatic adenocarcinoma following hormone therapy. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(4):553-561. doi:10.1309/H4JX-0XEh-DAC8-YL3P.
82. Sung M-T, Jiang Z, Montironi R, MacLennan GT, Mazzucchelli R, Cheng L. α -methylacyl-CoA racemase (P504S)/34 β E12/p63 triple cocktail stain in prostatic adenocarcinoma after hormonal therapy. *Hum Pathol*. 2007;38(2):332-341. doi:10.1016/j.humpath.2006.08.016.
83. Eggener SE, Scardino PT, Walsh PC, et al. Predicting 15-year prostate cancer specific mortality after radical prostatectomy. *J Urol*. 2011;185(3):869-875. doi:10.1016/j.juro.2010.10.057.
84. Pierorazio PM, Ross AE, Schaeffer EM, et al. A contemporary analysis of outcomes of adenocarcinoma of the prostate with seminal vesicle invasion (pT3b) after radical prostatectomy. *J Urol*. 2011;185(5):1691-1697. doi:10.1016/j.juro.2010.12.059.
85. Kristiansen A, Wiklund F, Wiklund P, Egevad L. Prognostic significance of patterns of seminal vesicle invasion in prostate cancer. *Histopathology*.

- 2013;62(7):1049-1056. doi:10.1111/his.12104.
86. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.* 1997;57(2):314-319. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9000575>. Accessed February 13, 2017.
 87. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet.* 1995;9(4):401-406. doi:10.1038/ng0495-401.
 88. Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, et al. ETS Gene Fusions in Prostate Cancer: From Discovery to Daily Clinical Practice. *Eur Urol.* 2009;56(2):275-286. doi:10.1016/j.eururo.2009.04.036.
 89. Blattner M, Lee DJ, O'Reilly C, et al. SPOP mutations in prostate cancer across demographically diverse patient cohorts. *Neoplasia.* 2014;16(1):14-20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24563616>. Accessed February 13, 2017.
 90. Cancer Genome Atlas Research Network A, Ahn J, Akbani R, et al. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell.* 2015;163(4):1011-1025. doi:10.1016/j.cell.2015.10.025.
 91. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001;410(6824):37-40. doi:10.1038/35065000.
 92. Rodríguez-Berriguete G, Fraile B, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Royuela M. MAP Kinases and Prostate Cancer. *J Signal Transduct.* 2012;2012(Figure 1):169170-169178. doi:10.1155/2012/169170.
 93. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene.* 2004;23(16):2838-2849. doi:10.1038/sj.onc.1207556.
 94. Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27(2):253-261. doi:10.1007/s10555-008-9123-1.
 95. Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(22):3525-3544. doi:10.1007/s00018-008-8170-7.
 96. Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(2):186-192. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712927>. Accessed February 13, 2017.
 97. Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. *J Cell Sci.* 2005;118(16):3569-3572. doi:10.1242/jcs.02470.
 98. Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4(1):82-89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8193545>. Accessed February 17, 2017.
 99. Morrison DK, Davis RJ. Regulation of MAP Kinase Signaling Modules by Scaffold Proteins in Mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003;19(1):91-118. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111401.091942.
 100. Junttila MR, Li S-P, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.* 2008;22(4):954-965. doi:10.1096/fj.06-7859rev.
 101. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22(2):153-183. doi:10.1210/edrv.22.2.0428.
 102. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 2006;24(1):21-44. doi:10.1080/02699050500284218.
 103. Agell N, Bachs O, Rocamora N, Villalonga P. Modulation of the

- Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. *Cell Signal*. 2002;14(8):649-654. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12020764>. Accessed February 17, 2017.
104. Tang D, Wu D, Hirao A, et al. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem*. 2002;277(15):12710-12717. doi:10.1074/jbc.M111598200.
 105. Friday BB, Adjei AA. K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1756(2):127-144. doi:10.1016/j.bbcan.2005.08.001.
 106. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):459-465. doi:10.1038/nrc1097.
 107. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3279-3290. doi:10.1038/sj.onc.1210421.
 108. Loda M, Capodiceci P, Mishra R, et al. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *Am J Pathol*. 1996;149(5):1553-1564. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8909245>. Accessed February 15, 2017.
 109. Gioeli D, Mandell JW, Petroni GR, Frierson HF, Weber MJ. Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res*. 1999;59(2):279-284. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927031>. Accessed February 18, 2017.
 110. Leav I, Galluzzi CM, Ziar J, Stork PJ, Ho SM, Loda M. Mitogen-activated protein kinase and mitogen-activated kinase phosphatase-1 expression in the Noble rat model of sex hormone-induced prostatic dysplasia and carcinoma. *Lab Invest*. 1996;75(3):361-370. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8804359>. Accessed February 18, 2017.
 111. Rodríguez-Berriguete G, Prieto A, Fraile B, et al. Relationship between IL-6/ERK and NF-κB: a study in normal and pathological human prostate gland. *Eur Cytokine Netw*. 2010;21(4):241-250. doi:10.1684/ecn.2010.0211.
 112. Pullikuth AK, Catling AD. Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective. *Cell Signal*. 2007;19(8):1621-1632. doi:10.1016/j.cellsig.2007.04.012.
 113. Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(22):1687-1697. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717329>. Accessed February 13, 2017.
 114. Bakin RE, Gioeli D, Sikes RA, Bissonette EA, Weber MJ. Constitutive activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway promotes androgen hypersensitivity in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2003;63(8):1981-1989. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12702592>. Accessed February 18, 2017.
 115. Kinkade CW, Castillo-Martin M, Puzio-Kuter A, et al. Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3051-3064. doi:10.1172/JCI34764.
 116. Carey A-M, Pramanik R, Nicholson LJ, et al. Ras-MEK-ERK signaling cascade regulates androgen receptor element-inducible gene transcription and DNA synthesis in prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 2007;121(3):520-527. doi:10.1002/ijc.22715.
 117. Heasley LE, Han S-Y. JNK regulation of oncogenesis. *Mol Cells*. 2006;21(2):167-173. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16682809>. Accessed February 18, 2017.

118. Wada T, Nakagawa K, Watanabe T, et al. Impaired Synergistic Activation of Stress-activated Protein Kinase SAPK/JNK in Mouse Embryonic Stem Cells Lacking SEK1/MKK4. DIFFERENT CONTRIBUTION OF SEK2/MKK7 ISOFORMS TO THE SYNERGISTIC ACTIVATION. *J Biol Chem*. 2001;276(33):30892-30897. doi:10.1074/jbc.M011780200.
119. Bode AM, Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog*. 2007;46(8):591-598. doi:10.1002/mc.20348.
120. Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*. 2007;26(22):3240-3253. doi:10.1038/sj.onc.1210415.
121. LIU J, LIN A. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Res*. 2005;15(1):36-42. doi:10.1038/sj.cr.7290262.
122. Ventura J-J, Hübner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, Davis RJ. Chemical Genetic Analysis of the Time Course of Signal Transduction by JNK. *Mol Cell*. 2006;21(5):701-710. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.018.
123. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007;26(22):3100-3112. doi:10.1038/sj.onc.1210392.
124. Bogoyevitch MA, Arthur PG. Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases—JunK no more? *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2008;1784(1):76-93. doi:10.1016/j.bbapap.2007.09.013.
125. Kennedy NJ, Sluss HK, Jones SN, Bar-Sagi D, Flavell RA, Davis RJ. Suppression of Ras-stimulated transformation by the JNK signal transduction pathway. *Genes Dev*. 2003;17(5):629-637. doi:10.1101/gad.1062903.
126. Joo SS, Yoo Y-M. Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer. *J Pineal Res*. 2009;47(1):8-14. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00682.x.
127. Royuela M, Arenas MI, Bethencourt FR, Sánchez-Chapado M, Fraile B, Paniagua R. Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostate. *Hum Pathol*. 2002;33(3):299-306. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11979370>. Accessed February 13, 2017.
128. Meshki J, Caino MC, von Burstin VA, Griner E, Kazanietz MG. Regulation of prostate cancer cell survival by protein kinase Cepsilon involves bad phosphorylation and modulation of the TNFalpha/JNK pathway. *J Biol Chem*. 2010;285(34):26033-26040. doi:10.1074/jbc.M110.128371.
129. Dérijard B, Hibi M, Wu IH, et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 1994;76(6):1025-1037. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137421>. Accessed February 18, 2017.
130. Kwon GT, Cho HJ, Chung W-Y, Park K-K, Moon A, Park JHY. Isoliquiritigenin inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased JNK/AP-1 signaling. *J Nutr Biochem*. 2009;20(9):663-676. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.06.005.
131. Lorenzo PI, Saatcioglu F. Inhibition of apoptosis in prostate cancer cells by androgens is mediated through downregulation of c-Jun N-terminal kinase activation. *Neoplasia*. 2008;10(5):418-428. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18472959>. Accessed February 13, 2017.
132. Gioeli D, Black BE, Gordon V, et al. Stress Kinase Signaling Regulates Androgen Receptor Phosphorylation, Transcription, and Localization. *Mol Endocrinol*. 2006;20(3):503-515. doi:10.1210/me.2005-0351.
133. Hui L, Bakiri L, Stepniak E, Wagner EF. p38 α : A Suppressor of Cell

- Proliferation and Tumorigenesis. *Cell Cycle*. 2007;6(20):2429-2433. doi:10.4161/cc.6.20.4774.
134. Thornton TM, Rincon M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci*. 2009;5(1):44-51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19159010>. Accessed February 13, 2017.
 135. Han J, Sun P. The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(8):364-371. doi:10.1016/j.tibs.2007.06.007.
 136. Wang XS, Diener K, Manthey CL, et al. Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1997;272(38):23668-23674. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9295308>. Accessed February 13, 2017.
 137. Matsumoto T, Yokote K, Tamura K, et al. Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J Biol Chem*. 1999;274(20):13954-13960. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10318806>. Accessed February 15, 2017.
 138. Kennedy NJ, Cellurale C, Davis RJ. A radical role for p38 MAPK in tumor initiation. *Cancer Cell*. 2007;11(2):101-103. doi:10.1016/j.ccr.2007.01.009.
 139. Pruitt K, Pruitt WM, Bilter GK, Westwick JK, Der CJ. Raf-independent deregulation of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases are critical for Ras transformation. *J Biol Chem*. 2002;277(35):31808-31817. doi:10.1074/jbc.M203964200.
 140. Feng Y, Wen J, Chang C-CJ. p38 Mitogen-activated protein kinase and hematologic malignancies. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(11):1850-1856. doi:10.1043/1543-2165-133.11.1850.
 141. Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Konishi N. Molecular roles of MAP kinases and FADD phosphorylation in prostate cancer. *Histol Histopathol*. 2006;21(4):415-422. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16437387>. Accessed February 15, 2017.
 142. Zhang Y-X, Kong C-Z. [The role of mitogen-activated protein kinase cascades in inhibition of proliferation in human prostate carcinoma cells by raloxifene: an in vitro experiment]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008;88(4):271-275. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18361842>. Accessed February 13, 2017.
 143. Senokuchi T, Matsumura T, Sakai M, et al. Statins suppress oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation by inactivation of the small G protein-p38 MAPK pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(8):6627-6633. doi:10.1074/jbc.M412531200.
 144. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1358-1375. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010.
 145. Ricote M, García-Tuñón I, Bethencourt F, et al. The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. *J Pathol*. 2006;208(3):401-407. doi:10.1002/path.1910.
 146. Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Konishi N. Molecular roles of MAP kinases and FADD phosphorylation in prostate cancer. *Histol Histopathol*. 2006;21(4):415-422. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16437387>. Accessed February 13, 2017.
 147. Briata P, Forcales SV, Ponassi M, et al. p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol Cell*. 2005;20(6):891-903. doi:10.1016/j.molcel.2005.10.021.
 148. Huang X, Chen S, Xu L, et al. Genistein inhibits p38 map kinase activation,

- matrix metalloproteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 2005;65(8):3470-3478. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2807.
149. Lin DL, Whitney MC, Yao Z, Keller ET. Interleukin-6 induces androgen responsiveness in prostate cancer cells through up-regulation of androgen receptor expression. *Clin Cancer Res.* 2001;7(6):1773-1781. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11410519>. Accessed February 18, 2017.
 150. Bulavin D V, Tararova ND, Aksenov ND, Pospelov VA, Pospelova T V. Deregulation of p53/p21Cip1/Waf1 pathway contributes to polyploidy and apoptosis of E1A+cHa-ras transformed cells after γ -irradiation. *Oncogene.* 1999;18(41):5611-5619. doi:10.1038/sj.onc.1202945.
 151. Tanoue T, Nishida E. Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol Ther.* 93(2-3):193-202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191611>. Accessed February 13, 2017.
 152. Kondoh K, Nishida E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1227-1237. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.12.002.
 153. Camps M, Nichols A, Gillieron C, et al. Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science.* 1998;280(5367):1262-1265. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9596579>. Accessed February 13, 2017.
 154. Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene.* 2007;26(22):3203-3213. doi:10.1038/sj.onc.1210412.
 155. Theodosiou A, Ashworth A. Differential effects of stress stimuli on a JNK-inactivating phosphatase. *Oncogene.* 2002;21(15):2387-2397. doi:10.1038/sj.onc.1205309.
 156. Theodosiou A, Ashworth A. MAP kinase phosphatases. *Genome Biol.* 2002;3(7):REVIEWS3009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184814>. Accessed February 13, 2017.
 157. Nichols A, Camps M, Gillieron C, et al. Substrate recognition domains within extracellular signal-regulated kinase mediate binding and catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3. *J Biol Chem.* 2000;275(32):24613-24621. doi:10.1074/jbc.M001515200.
 158. Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J.* 2009;418(3):475-489. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228121>. Accessed February 13, 2017.
 159. Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD. MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(3):202-212. doi:10.1038/nri2035.
 160. Dickinson RJ, Keyse SM. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 22):4607-4615. doi:10.1242/jcs.03266.
 161. Muda M, Theodosiou A, Rodrigues N, et al. The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1996;271(44):27205-27208. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910287>. Accessed February 13, 2017.
 162. Theodosiou A, Smith A, Gillieron C, Arkinstall S, Ashworth A. MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases. *Oncogene.* 1999;18(50):6981-6988. doi:10.1038/sj.onc.1203185.
 163. Magi-Galluzzi C, Luo J, Isaacs WB, Hicks JL, de Marzo AM, Epstein JI. Alpha-

- methylacyl-CoA racemase: a variably sensitive immunohistochemical marker for the diagnosis of small prostate cancer foci on needle biopsy. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(8):1128-1133. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12883245>. Accessed February 13, 2017.
164. Jeffrey KL, Brummer T, Rolph MS, et al. Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nat Immunol*. 2006;7(3):274-283. doi:10.1038/ni1310.
 165. Camps M, Nichols A, Arkinstall S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J*. 2000;14(1):6-16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627275>. Accessed February 18, 2017.
 166. Wu JJ, Bennett AM. Essential Role for Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Phosphatase-1 in Stress-responsive MAP Kinase and Cell Survival Signaling. *J Biol Chem*. 2005;280(16):16461-16466. doi:10.1074/jbc.M501762200.
 167. Zhao Q, Wang X, Nelin LD, et al. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J Exp Med*. 2006;203(1):131-140. doi:10.1084/jem.20051794.
 168. Zhou J-Y, Liu Y, Wu GS. The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 in Oxidative Damage-Induced Cell Death. *Cancer Res*. 2006;66(9):4888-4894. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4229.
 169. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420(6913):333-336. doi:10.1038/nature01137.
 170. Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2008;27(2):253-261. doi:10.1007/s10555-008-9123-1.
 171. Brondello JM, Pouyssegur J, McKenzie FR. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science*. 1999;286(5449):2514-2517. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617468>. Accessed February 13, 2017.
 172. Lin Y-W, Yang J-L. Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 Destruction Provides a Positive Feedback Regulation of Proliferating Signaling. *J Biol Chem*. 2006;281(2):915-926. doi:10.1074/jbc.M508720200.
 173. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science (80-)*. 2002;295(5561):1852-1858. doi:10.1126/science.1068408.
 174. Hammond EM, Kaufmann MR, Giaccia AJ. Oxygen sensing and the DNA-damage response. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(6):680-684. doi:10.1016/j.ceb.2007.10.002.
 175. Hutter D, Chen P, Li J, Barnes J, Liu Y. The carboxyl-terminal domains of MKP-1 and MKP-2 have inhibitory effects on their phosphatase activity. *Mol Cell Biochem*. 2002;233(1-2):107-117. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12083364>. Accessed February 15, 2017.
 176. Hutter D, Chen P, Barnes J, Liu Y. Catalytic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 by binding to p38 MAP kinase: critical role of the p38 C-terminal domain in its negative regulation. *Biochem J*. 2000;352 Pt 1:155-163. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11062068>. Accessed February 15, 2017.
 177. Dickinson RJ, Eblaghie MC, Keyse SM, Morriss-Kay GM. Expression of the ERK-specific MAP kinase phosphatase PYST1/MKP3 in mouse embryos during morphogenesis and early organogenesis. *Mech Dev*. 2002;113(2):193-196. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11960712>. Accessed February 15, 2017.
 178. Eblaghie MC, Lunn JS, Dickinson RJ, et al. Negative feedback regulation of FGF

- signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos. *Curr Biol.* 2003;13(12):1009-1018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814546>. Accessed February 15, 2017.
179. Kawakami Y, Rodríguez-León J, Koth CM, et al. MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nat Cell Biol.* 2003;5(6):513-519. doi:10.1038/ncb989.
 180. Marchetti S, Gimond C, Chambard J-C, et al. Extracellular Signal-Regulated Kinases Phosphorylate Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 3/DUSP6 at Serines 159 and 197, Two Sites Critical for Its Proteasomal Degradation. *Mol Cell Biol.* 2005;25(2):854-864. doi:10.1128/MCB.25.2.854-864.2005.
 181. Bermudez O, Marchetti S, Pagès G, Gimond C. Post-translational regulation of the ERK phosphatase DUSP6/MKP3 by the mTOR pathway. *Oncogene.* 2008;27(26):3685-3691. doi:10.1038/sj.onc.1211040.
 182. Castelli M, Camps M, Gillieron C, et al. MAP kinase phosphatase 3 (MKP3) interacts with and is phosphorylated by protein kinase CK2alpha. *J Biol Chem.* 2004;279(43):44731-44739. doi:10.1074/jbc.M407669200.
 183. Gerits N, Kostenko S, Moens U. In vivo functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice. *Transgenic Res.* 2007;16(3):281-314. doi:10.1007/s11248-006-9052-0.
 184. Schwacke JH, Voit EO. Concentration-dependent effects on the rapid and efficient activation of the MAP kinase signaling cascade. *Proteomics.* 2007;7(6):890-899. doi:10.1002/pmic.200600927.
 185. Fabregat I, Roncero C, Fernández M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int.* 2007;27(2):155-162. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01409.x.
 186. Bang YJ, Kwon JH, Kang SH, Kim JW, Yang YC. Increased MAPK activity and MKP-1 overexpression in human gastric adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250(1):43-47. doi:10.1006/bbrc.1998.9256.
 187. Manzano RG, Montuenga LM, Dayton M, et al. CL100 expression is down-regulated in advanced epithelial ovarian cancer and its re-expression decreases its malignant potential. *Oncogene.* 2002;21(28):4435-4447. doi:10.1038/sj.onc.1205542.
 188. Tsujita E, Taketomi A, Gion T, et al. Suppressed MKP-1 is an independent predictor of outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology.* 2005;69(4):342-347. doi:10.1159/000089766.
 189. St John MA, Dohadwala M, Luo J, et al. Proinflammatory mediators upregulate snail in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):6018-6027. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0011.
 190. Wang J, Zhou J-Y, Wu GS. ERK-dependent MKP-1-mediated cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(24):11933-11941. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5185.
 191. Cortes-Sempere M, Chattopadhyay S, Rovira A, et al. MKP1 repression is required for the chemosensitizing effects of NF-kappaB and PI3K inhibitors to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2009;286(2):206-216. doi:10.1016/j.canlet.2009.05.029.
 192. Small GW, Shi YY, Higgins LS, Orlowski RZ. Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 Is a Mediator of Breast Cancer Chemoresistance. *Cancer Res.* 2007;67(9):4459-4466. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2644.
 193. Shen J, Zhang Y, Yu H, et al. Role of DUSP1/MKP1 in tumorigenesis, tumor progression and therapy. *Cancer Med.* 2016;5(8):2061-2068.

- doi:10.1002/cam4.772.
194. Xu S, Furukawa T, Kanai N, Sunamura M, Horii A. Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. *J Hum Genet.* 2005;50(4):159-167. doi:10.1007/s10038-005-0235-y.
 195. Okudela K, Yazawa T, Woo T, et al. Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancer: its mechanism and potential role in carcinogenesis. *Am J Pathol.* 2009;175(2):867-881. doi:10.2353/ajpath.2009.080489.
 196. Chan DW, Liu VWS, Tsao GSW, et al. Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis.* 2008;29(9):1742-1750. doi:10.1093/carcin/bgn167.
 197. Furukawa T, Fujisaki R, Yoshida Y, et al. Distinct progression pathways involving the dysfunction of DUSP6/MKP-3 in pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol.* 2005;18(8):1034-1042. doi:10.1038/modpathol.3800383.
 198. Arnoldussen YJ, Lorenzo PI, Pretorius ME, et al. The Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase Vaccinia H1-Related Protein Inhibits Apoptosis in Prostate Cancer Cells and Is Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2008;68(22):9255-9264. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1224.
 199. Cózar JM, Miñana B, Gómez-Veiga F, et al. Registro nacional de cáncer de próstata 2010 en España. *Actas Urológicas Españolas.* 2013;37(1):12-19. doi:10.1016/j.acuro.2012.06.006.
 200. Qi X-J, Wildey GM, Howe PH. Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function. *J Biol Chem.* 2006;281(2):813-823. doi:10.1074/jbc.M505546200.
 201. Steelman LS, Bertrand FE, McCubrey JA. The complexity of PTEN: mutation, marker and potential target for therapeutic intervention. *Expert Opin Ther Targets.* 2004;8(6):537-550. doi:10.1517/14728222.8.6.537.
 202. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1263-1284. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.001.
 203. Wu GS. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 2004;3(2):156-161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764989>. Accessed February 28, 2017.
 204. Nonn L, Peng L, Feldman D, Peehl DM. Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase phosphatase 5: implications for prostate cancer prevention by vitamin D. *Cancer Res.* 2006;66(8):4516-4524. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3796.
 205. Sawhney RS, Liu W, Brattain MG. A novel role of ERK5 in integrin-mediated cell adhesion and motility in cancer cells via Fak signaling. *J Cell Physiol.* 2009;219(1):152-161. doi:10.1002/jcp.21662.
 206. Arnoldussen YJ, Saatcioglu F. Dual specificity phosphatases in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;309(1-2):1-7. doi:10.1016/j.mce.2009.05.019.
 207. Royuela M, De Miguel MP, Bethencourt FR, Sanchez-Chapado M, Fraile B, Paniagua R. Transforming growth factor beta 1 and its receptor types I and II. Comparison in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. *Growth Factors.* 1998;16(2):101-110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9932228>. Accessed February 20, 2017.
 208. Keller ET, Fu Z, Yeung K, Brennan M. Raf kinase inhibitor protein: a prostate cancer metastasis suppressor gene. *Cancer Lett.* 2004;207(2):131-137. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15151133>. Accessed February 20, 2017.

209. Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res.* 2003;63(7):1684-1695. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12670923>. Accessed February 20, 2017.
210. Dorkin TJ, Neal DE. Basic science aspects of prostate cancer. *Semin Cancer Biol.* 1997;8(1):21-27. doi:10.1006/scbi.1997.0049.
211. Chen Y, Sawyers CL, Scher HI. Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8(4):440-448. doi:10.1016/j.coph.2008.07.005.
212. Ouyang X, Jessen WJ, Al-Ahmadie H, et al. Activator Protein-1 Transcription Factors Are Associated with Progression and Recurrence of Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2008;68(7):2132-2144. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6055.
213. Lee JT, Steelman LS, McCubrey JA. Modulation of Raf/MEK/ERK kinase activity does not affect the chemoresistance profile of advanced prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 2005;26(6):1637-1644. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15870880>. Accessed February 27, 2017.
214. Rodríguez-Berriguete G, Fraile B, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Royuela M. MAP Kinases and Prostate Cancer. *J Signal Transduct.* 2012;2012:169170. doi:10.1155/2012/169170.
215. Bermudez O, Pages G, Gimond C. The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299(2):C189-202. doi:10.1152/ajpcell.00347.2009.
216. Mukherjee R, McGuinness DH, McCall P, et al. Upregulation of MAPK pathway is associated with survival in castrate-resistant prostate cancer. *Br J Cancer.* 2011;104(12):1920-1928. doi:10.1038/bjc.2011.163.
217. Wise SC, Burmeister LA, Zhou XF, et al. Identification of domains of c-Jun mediating androgen receptor transactivation. *Oncogene.* 1998;16(15):2001-2009. doi:10.1038/sj.onc.1201697.

